

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen von Glaskörperproben aus an equiner rezidivierender  
Uveitis (ERU) erkrankten Augen im Hinblick auf Leptospiren und  
deren Biofilmbildung

von Kerstin Ackermann

aus Mainz

München 2021

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

ehemaliger Lehrstuhl für Innere Medizin und Chirurgie des Pferdes sowie für Gerichtliche  
Tiermedizin

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Priv.-Doz. Dr. Bettina Wollanke

Mitbetreuung durch: Priv.-Doz. Dr. Rebecca Kenngott

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatte: Priv.-Doz. Dr. Bettina Wollanke

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.  
Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Korbel  
Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka  
Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Tag der Promotion: 17. Juli 2021

Meinem Vater

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Biofilm</b>	<b>3</b>
1.1.	Definition von Biofilm	3
1.2.	Bildung von Biofilm	4
1.3.	Warum bilden Bakterien Biofilm	5
1.4.	Resistenz von Biofilm gegen antimikrobielle Wirkstoffe	7
1.4.1.	Verzögerte Penetration	7
1.4.2.	Verringerte Wachstumsrate	8
1.5.	Resistenz der Biofilmbakterien gegen das Immunsystem des Wirts	8
1.6.	Biofilm an medizinischen Geräten	9
1.6.1.	Herzklappenprothesen	9
1.6.2.	Zentralvenenkatheter	9
1.6.3.	Kontaktlinsen	10
1.7.	Kriterien Biofilm-assoziiierter Infektionen	11
1.8.	Biofilm-assoziierte Infektionen beim Menschen	12
1.8.1.	Parodontitis	12
1.8.2.	Mukoviszidose	12
1.9.	Biofilm bei Spirochaeten	13
1.9.1.	Treponema	13
1.9.2.	Borrelien	14
1.9.2.1.	Biofilm bei <i>Borrelia burgdorferi</i> in vitro	14
1.9.2.2.	Biofilm bei <i>Borrelia burgdorferi</i> in vivo	15
1.9.3.	Leptospiren	16
<b>2.</b>	<b>Equine Rezidivierende Uveitis</b>	<b>17</b>
2.1.	Definition der ERU	17
2.2.	Ätiologie und Pathogenese der ERU	17
2.3.	Klinisch-ophthalmologische Symptome der ERU	20
2.4.	Diagnose der ERU	22
2.5.	Therapie der ERU	23
<b>3.</b>	<b>Leptospiren</b>	<b>24</b>

3.1.	Taxonomie und Morphologie	24
3.2.	Epidemiologie	25
3.3.	Leptospirose beim Menschen	26
3.4.	Leptospireninfektion beim Pferd	27
3.5.	Intraokulare Leptospireninfektion und Uveitis beim Pferd	27
3.6.	Labordiagnostik auf eine Leptospireninfektion	28
3.6.1.	Indirekter Nachweis	28
3.6.1.1.	Mikroagglutinationsreaktion (MAR)	28
3.6.1.2.	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	29
3.6.2.	Direkter Nachweis	30
3.6.2.1.	Mikroskopischer Nachweis	30
3.6.2.1.1.	Elektronenmikroskopischer Nachweis	30
3.6.2.2.	Kultureller Nachweis	31
3.6.2.3.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
3.6.2.4.	Immunhistochemische Färbung	32
3.6.2.5.	Silberimprägnierung	32
3.6.3.	Nachweis einer Leptospiren-bedingten rezidivierenden Uveitis bei Pferden	33
3.6.3.1.	Nachweis von Antikörpern im Serum mittels MAR	33
3.6.3.2.	Nachweis von Antikörpern in Kammerwasser- und Glaskörperproben	33
3.6.3.3.	Nachweis von Antikörpern mittels „Snap-Lepto <sup>®</sup> “-ELISA	34
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>35</b>
<b>1.</b>	<b>Übersicht</b>	<b>35</b>
<b>2.</b>	<b>Patientengut</b>	<b>36</b>
<b>3.</b>	<b>Diagnosestellung</b>	<b>36</b>
<b>4.</b>	<b>Probenmaterial</b>	<b>41</b>
4.1.	Kulturleptospiren	41
4.2.	Glaskörperproben	41
4.3.	Negativkontrollen	43
<b>5.</b>	<b>Probenbearbeitung</b>	<b>43</b>
5.1.	Labordiagnostische Untersuchungen	43
5.2.	Herstellung der Ausstriche für die histologischen Färbungen	43
5.2.1.	Silberimprägnierung	44

---

5.2.2.	Immunhistochemische Färbung	45
5.3.	Auswertung	47
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>48</b>
<b>1.</b>	<b>Morphologische Darstellung der Kulturleptospiren</b>	<b>48</b>
1.1.	Silberimprägnierung	48
1.2.	Immunhistochemische Färbung	55
<b>2.</b>	<b>Morphologische Darstellung von Leptospiren in Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen</b>	<b>59</b>
2.1.	Silberimprägnierung	60
2.2.	Immunhistochemische Färbung	74
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>86</b>
<b>1.</b>	<b>Hintergrund der vorliegenden Arbeit</b>	<b>86</b>
<b>2.</b>	<b>Methode</b>	<b>90</b>
<b>3.</b>	<b>Interpretation der Ergebnisse</b>	<b>91</b>
3.1.	Nachweis von Leptospiren in den Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen	91
3.2.	Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Warthin-Starry-Färbung und der Färbung mit Hilfe des spezifischen Antikörpers	91
3.3.	Stadien der Biofilmbildung der Leptospiren im Glaskörper	92
3.4.	Vergleich der Kulturleptospiren mit den in den Glaskörperproben nachgewiesenen Leptospiren	93
<b>4.</b>	<b>Biofilmbildung im Glaskörperraum</b>	<b>95</b>
<b>5.</b>	<b>Weitere Mechanismen, die die Leptospiren-Persistenz im Glaskörperraum begünstigen können</b>	<b>95</b>
5.1.	Hämatookulare Barriere	95
5.2.	Der Glaskörper als „immunologische Nische“ oder immunologisch privilegierter Ort	96
5.3.	Immuntoleranz des inneren Auges	96
5.3.1.	Anterior chamber associated immunodeviation	96
5.3.2.	Vitreous chamber associated immunodeviation	97
5.4.	Besonderheiten der Grenzflächengewebe = Locus minoris resistentiae	97

---

<b>6.</b>	<b>Bedeutung des Nachweises der Biofilmbildung für die ERU</b>	<b>98</b>
6.1.	Chronisch rezidivierende Uveitis	98
6.2.	Jahrelange Persistenz	98
<b>7.</b>	<b>Fazit</b>	<b>99</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>100</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>102</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>104</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>134</b>
1.	Lösungen und Puffer	134
2.	Antikörper	135
3.	Patientengut	136
<b>X.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>142</b>
<b>XI.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>147</b>
<b>XII.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>
<b>XIII.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>148</b>



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ACAID	anterior chamber associated immunodeviation
Ag	Antigen
AK	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata
<i>B. burgdorferi</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
CF	Cystic Fibrosis; Mukoviszidose
DNA	desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen
ERU	Equine Rezidivierende Uveitis
IHC	Immunhistochemie
IRBP	Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein
Kap.	Kapitel
<i>L. Australis</i>	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar Australis
<i>L. Autumnalis</i>	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar Autumnalis
<i>L. biflexa</i>	<i>Leptospira biflexa</i>
<i>L. Bratislava</i>	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar Bratislava
<i>L. Grippotyphosa</i>	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar Grippotyphosa
<i>L. Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar Icterohaemorrhagiae
<i>L. interrogans</i>	<i>Leptospira interrogans</i>
<i>L. Pomona</i>	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar Pomona
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
MAR	Mikroagglutinationsreaktion
Min.	Minute/n
ml	Milliliter
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug; nichtsteroidales Antiphlogistikum
OT	Objektträger
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Poymerase Chain Reaktion; Polymerasekettenreaktion
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Sek.	Sekunde/n
sog.	sogenannt
spp.	Species pluralis
s.	siehe
ZVK	Zentralvenenkatheter

## I. EINLEITUNG

Die Equine rezidivierende Uveitis (ERU), bekannt als eine intraokulare Leptospireninfektion (Wollanke et al., 2004), zeigt sich durch wiederkehrende, für das Pferd sehr schmerzhaftes Entzündungsschübe des inneren Auges. Diese führen im weiteren Verlauf, durch Zerstörung intraokularer Strukturen, schließlich zur Erblindung des betroffenen Auges (Gerhards u. Wollanke, 2001). Leptospiren können nach der normalerweise subklinisch verlaufenden bakteriämischen Phase jahrelang persistieren. Die chronische Infektion betrifft neben den proximalen Nierentubuli auch den Glaskörper (Quinn, 1994).

Eine mögliche Erklärung für die jahrelange Persistenz der Leptospiren im Glaskörper, trotz hoher Antikörpertiter in der Mikroagglutinationsreaktion (MAR) und der Anwesenheit immunkompetenter Zellen ist die intraokulare Biofilmbildung von Leptospiren. Hinweise darauf liefern frühere histologische Untersuchungen von Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich bei Leptospiren, die in Glaskörperproben gefunden wurden, eine amorphe Masse um die Leptospiren bildet (Niedermaier, 2002).

Die Bildung mikrobieller Biofilme spielt sowohl in der Humanmedizin als auch in der Tiermedizin eine bedeutende Rolle. Die Beteiligung von Biofilm bei chronischen bakteriellen Infektionen in der Humanmedizin wird auf ca. 80 % geschätzt (Joo u. Otto, 2012). Bakterien im Biofilm können sich schnell an sich ändernde Umweltbedingungen anpassen. Des Weiteren dient der Biofilm als "Versteck", sodass die Bakterien vor antimikrobiellen Wirkstoffen durch therapeutische Maßnahmen aber auch vor der Eliminierung durch Phagozytose geschützt sind. Die Bakterien im Biofilm können durch das körpereigene Immunsystem oft nicht vollständig eliminiert werden. Demzufolge ist ihnen ein Langzeitüberleben im Wirt gesichert, wodurch bakterielle Infektionen ihren chronisch rezidivierenden Charakter erlangen und die Bekämpfung dieser Bakterien massiv erschwert wird (Costerton, 1999, Costerton et al., 1999, Lewis, 2001, Jefferson, 2004).

Für viele unterschiedliche Bakterien, z.B. *Pseudomonas aeruginosa*, *Treponema denticola* und *Borrelia burgdorferi* konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass sie im Stande sind, Biofilm zu bilden (Donlan u. Costerton, 2002, Vesey u. Kuramitsu, 2004, Sapi et al., 2012). Bei pathogenen und apathogenen Leptospiren konnte bereits durch *in vitro* Versuche

nachgewiesen werden, dass auch bei dieser Gattung die Bildung von Biofilm möglich ist (Ristow et al., 2008). Morphologisch sehr ähnliche rundliche Strukturen finden sich in der Arbeit von Brandes und Mitarbeitern, die dort zwar nicht entsprechend interpretiert worden waren, bei denen es sich jedoch auch um Biofilm handeln könnte (Brandes et al., 2007).

Ziel dieser Dissertation war es, die Biofilmbildung pathogener Leptospiren *in vivo* im Pferdeauge zu untersuchen. Hierzu wurden im Rahmen von Vitrektomien gewonnene Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen verwendet.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Biofilm**

#### **1.1. Definition von Biofilm**

Durch die zunehmende medizinische Bedeutung bakterieller Biofilme in den letzten Jahrzehnten hat sich auch die Definition von Biofilm ständig weiterentwickelt. Die ersten Beschreibungen von Biofilm reichen bis ins 17. Jahrhundert zurück (Jamal et al., 2018). Im Jahr 1976 beobachtete Marshall die Beteiligung von sehr feinen extrazellulären, polymeren Fibrillen, die es Bakterien ermöglicht haben, sich an Oberflächen zu verankern (Marshall, 1976). Costerton und Mitarbeiter beobachteten Bakterienkolonien, umhüllt von einer Glykokalix-Matrix, bestehend aus Polysacchariden, welche wiederum für die Adhäsion an einer Oberfläche verantwortlich sind (Costerton et al., 1978). Einige Jahre später beobachteten Costerton und Coautoren, dass Biofilm sowohl aus einzelnen Zellen, als auch aus Mikrokolonien bestehen kann, die in einer stark hydratisierten anionischen extrazellulären polymeren Matrix eingebettet sind (Costerton et al., 1987). Weitere Untersuchungen zeigten, dass mikrobielle Zellen in Biofilm nicht nur an Oberflächen und Grenzflächen, sondern auch ohne festen Untergrund aneinander haften können (Costerton et al., 1995). 1995 wurde beschrieben, dass die initiale Adhäsion der Bakterien letztendlich die Expression von Genen auslöst, die wiederum die Produktion von Bakterienkomponenten steuern. Diese Komponenten sind auch für die Biofilmbildung notwendig (Costerton u. Lappin-Scott, 1995).

Die neueste Definition von Biofilm, die die Vielfalt der Merkmale berücksichtigt, wird als ein mikrobielles Zellaggregat beschrieben, welches an einer lebenden oder nicht lebenden Oberfläche haftet und in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) mikrobiellen Ursprungs eingebettet ist. Biofilm-assoziierte EPS sind Makromoleküle, Nukleinsäuren, Proteine, Polysaccharide und Lipide (Flemming u. Wingender, 2010). Percival und Mitarbeiter ergänzten die Tatsache, dass die bakteriellen Zellen in den Mikrokolonienkolonien über wassergefüllte Kanäle verbunden sind und so miteinander kommunizieren können (Percival et al., 2011).

## **1.2. Bildung von Biofilm**

Die Bildung von Biofilm läuft generell nach einem definierten Schema ab (Jamal et al., 2018):

- 1) Initialer Kontakt der Bakterien und Anhaftung an eine Oberfläche
- 2) Entstehung von Mikrokolonien
- 3) Synthetisierung der Biofilm-Matrix
- 4) Freisetzung von Bakterien/ Streuung von Teilen des Biofilms

Der initiale Kontakt der Bakterien und die Anhaftung an eine Oberfläche führt zu einer sofortigen Veränderung der Genregulation (Kuchma u. O'Toole, 2000, O'Toole et al., 2000). Die so ausgelöste Signalkaskade in der Genexpression ist ein wesentlicher Schritt der bakteriellen Biofilmbildung (Davies u. Geesey, 1995, Kodjikian et al., 2003). Die anschließende Bildung von Mikrokolonien entsteht durch Zellteilung der Organismen, die durch chemische Signalwege ausgelöst wird (Jamal et al., 2018).

Die Synthetisierung des Biofilms erfolgt durch die Expression von Genen, die die Produktion von Bakterienkomponenten steuern. Die Expression dieser Gene wird bereits durch den initialen Kontakt der Bakterien untereinander ausgelöst (Costerton u. Lappin-Scott, 1995). Die Kommunikation der Bakterien und der Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten innerhalb der Mikrokolonien erfolgt über interstitielle wassergefüllte Hohlräume (Percival et al., 2011).

Sowohl spontan als auch unter Stressbedingungen kommt es zur Abspaltung von sowohl einzelnen Bakterien als auch von Anteilen des Biofilms (Jamal et al., 2018).

### 1.3. Warum bilden Bakterien Biofilm

Die Bildung von Biofilm ist eine Anpassung an eine sich verändernde Umgebung. Die Grundlagen der Biofilmbildung können nach Jefferson in folgende Punkte unterteilt werden (Jefferson, 2004):

1. Verteidigung gegen eine Stressreaktion
2. Verweilen in einer bevorzugten biologischen Nische
3. Gemeinschaftsverhalten
4. Verharren in einem Standard-Wachstumsmodus

Ad 1.

Biofilme sind gegenüber physikalischen Kräften sehr resistent, wie z.B. den Scherkräften, die vom Blutfluss erzeugt werden, oder gegenüber der Waschwirkung von Speichel. Die Bakterien innerhalb eines Biofilms können Nährstoffmangel, pH-Wert Veränderungen, Sauerstoffradikalen, Desinfektionsmitteln und Antibiotika standhalten. Bakterien innerhalb des Biofilms sind außerdem widerstandsfähig gegenüber der Phagozytose durch Entzündungszellen des Immunsystems. Es wird sogar angenommen, dass die Phagozyten bei ihrem Angriff das umliegende Gewebe mehr schädigen als den Biofilm und die darin enthaltenen Mikroorganismen selbst (Jefferson, 2004).

Bestimmte chronische Infektionen sind unbestreitbar auf die Entwicklung eines widerstandsfähigen Biofilms zurückzuführen (Jefferson, 2004). Für die Widerstandsfähigkeit des Biofilms werden unter anderem das langsame Wachstum und die physiologische Heterogenität der Bakterien verantwortlich gemacht. Eine weitere wichtige Rolle spielen hierbei die EPS, welche den überwiegenden Bestandteil der Matrix des Biofilms bilden. Diese EPS spielen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr und ermöglichen es dem Biofilm, physikalischen Scherkräften und der Phagozytose durch Entzündungszellen zu widerstehen (Donlan u. Costerton, 2002). Des Weiteren wird eine Toleranz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen vermutet (Lewis, 2001) (s. Kap. II.1.4.).

## Ad 2.

Das menschliche und tierische Immunsystem verfolgt das Ziel, pathogene Mikroorganismen zu bekämpfen, die fortwährend versuchen, den Körper zu bewohnen. Aufgrund dieser Tatsache entwickeln Bakterien Strategien, dem Immunsystem zu entkommen (Jefferson, 2004). In manchen Fällen wird ein Kompromiss gefunden und der Körper wird von einer großen Anzahl von Kommensalen bewohnt, von denen viele als Biofilm existieren (Yamaguchi et al., 2018). Eine Strategie von Bakterien, um das Überleben im menschlichen Körper sicher zu stellen, ist die Expression von Oberflächenproteinen. Mit diesen Oberflächenproteinen können Bakterien an extrazelluläre Proteine des Wirtes binden. Damit ist bereits der entscheidende Schritt für die Biofilmproduktion, die initiale Anhaftung der Bakterien an eine stabile Oberfläche, gewährleistet (Patti et al., 1994).

## Ad 3.

Eine Hypothese über bakterielles Verhalten ist, dass Biofilme als mehrzellige Organismen betrachtet werden können und die Bakterien innerhalb des Biofilms kooperatives, selbstloses Verhalten zeigen (Shapiro, 1998). Bakterien können von einer vielzelligen Zusammenarbeit profitieren, indem sie sich das Prinzip der Arbeitsteilung zunutze machen. So können sie auf Ressourcen zurückgreifen, welche von einzelnen Zellen nicht optimal genutzt werden können und sich gemeinsam gegen Angriffe verteidigen, um das Überleben der Population zu sichern (Jefferson, 2004).

## Ad 4.

Viele Bakterienarten scheinen das Wachstum des Biofilm-Modus konstitutiv zu nutzen, wie es z.B. bei Bakterien in der Mundhöhle zu beobachten ist. Vielen oralen Bakterien, z.B. *Streptococcus salivarius* oder *Streptococcus mutans*, fehlt eine Umweltische und sie kommen fast ausschließlich in der Mundhöhle vor (Burne et al., 2003). Die Bildung von Biofilm ist überlebenswichtig, da sie ohne diesen vom Speichel weggewaschen und von der Magensäure zerstört werden würden (Burne et al., 2003). Somit ist für zumindest einige Bakterien der Biofilm-Wachstumsmodus die Standardeinstellung, um das eigene Überleben zu sichern (Jefferson, 2004).



#### **1.4. Resistenz von Biofilm gegen antimikrobielle Wirkstoffe**

Als Resistenz bezeichnet man in der Medizin im engeren Sinn die Widerstandsfähigkeit eines Organismus gegenüber negativen äußeren Einflüssen.

Die strukturellen und physiologischen Eigenschaften der Biofilmorganismen weisen eine enorme Resistenz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen, Desinfektionsmitteln und anderen Germiziden auf. Die Mechanismen, die dafür verantwortlich sind, sind zum einen die verzögerte Penetration des antimikrobiellen Wirkstoffes durch den Biofilm und zum anderen die verringerte Wachstumsrate der Organismen (Donlan u. Costerton, 2002).

##### **1.4.1. Verzögerte Penetration**

Antimikrobielle Moleküle müssen durch die Biofilmmatrix diffundieren, um die darin eingeschlossenen Bakterien zu inaktivieren. Die von den Mikroorganismen selbst produzierte Matrix, welche überwiegend aus EPS besteht, bildet eine Diffusionsbarriere für diese Moleküle. Zum einen wird hierdurch die Transportgeschwindigkeit der antimikrobiellen Moleküle zum Inneren des Biofilms beeinflusst, zum anderen spielt die Reaktion der antimikrobiellen Moleküle mit dem Biofilm selbst eine große Rolle (Donlan u. Costerton, 2002).

Dies konnte für die verzögerte Penetration von Ciprofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt werden. Die normalerweise erforderliche Zeit zur Penetration der Oberfläche dauert 40 Sek., die für eine Biofilm enthaltende Oberfläche 21 Min. (Suci et al., 1994). Auch für Tobramycin konnte festgestellt werden, dass Bakterienzellen ohne Biofilm 15-mal schneller eliminiert werden konnten als solche mit intaktem Biofilm (Hoyle et al., 1992). Auch durch Untersuchungen der Empfindlichkeit von *Staphylococcus epidermidis* gegenüber Tobramycin stellten die Autoren fest, dass die Organisation von Zellen innerhalb von Biofilmen teilweise die Resistenz dieser Mikroorganismen gegen antimikrobielle Wirkstoffe erklären kann (Duguid et al., 1992).

### 1.4.2. Verringerte Wachstumsrate

Ein weiterer Mechanismus für die Resistenz von Biofilmen gegen antimikrobielle Wirkstoffe ist die Tatsache, dass Bakterien im Biofilm deutlich langsamer wachsen als Bakterien ohne Biofilm. Hieraus resultiert die langsamere Aufnahme von antimikrobiellen Wirkstoffen und die daraus folgende schlechtere Wirksamkeit. In Untersuchungen mit *Pseudomonas aeruginosa* konnte festgestellt werden, dass ältere Bakterien im Biofilm deutlich resistenter gegenüber Tobramycin und Piperacillin waren als jüngere Biofilm-Zellen (Anwar et al., 1992). Ähnliche Ergebnisse konnten für weitere Bakterienarten, wie z.B. *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* und *Burkholderia cepacia* sowie für verschiedene antimikrobielle Wirkstoffe, wie z.B. Ciprofloxacin und Ceftazidim beobachtet werden (Evans et al., 1990, Duguid et al., 1992, Chuard et al., 1993, Desai et al., 1998, Amorena et al., 1999).

### 1.5. Resistenz der Biofilmbakterien gegen das Immunsystem des Wirts

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch den Biofilm die Abwehrfunktion des Immunsystems gestört wird und damit keine Eliminierung der Erreger erreicht werden kann.

In *in vitro* Versuchen wurde herausgefunden, dass die phagozytische Aktivität von Makrophagen durch den von *Staphylococcus epidermidis* produzierten extrazellulären Schleim beeinträchtigt wird (Shiau u. Wu, 1998). Für Patienten mit chronischer Mukoviszidose und bakterieller Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass die Eliminierung durch Phagozytose von Bakterienzellen, die in einem Biofilm wachsen, nicht ausreichend wirksam ausgelöst werden konnte (Meluleni et al., 1995).

Ward und Mitarbeiter zeigten 1992 an einem Kaninchenmodell, bei dem ein mit Biofilm besiedeltes Implantat in die Peritonealhöhle eingesetzt wurde, dass das Bakterienwachstum innerhalb des Biofilms durch das Immunsystem des Tieres nicht beeinflusst wurde. Die Tiere hatten im Vergleich mit der Kontrollgruppe einen 1000-fach erhöhten AK-Titer, jedoch konnten die Antikörper die Bakterienzellen durch den Biofilm nicht erreichen (Ward et al., 1992). Daraus schlussfolgerten sie, dass Organismen, die in einem Biofilm wachsen, das Immunsystem leichter überwinden und somit eine chronische Infektion unterhalten können.

## **1.6. Biofilm an medizinischen Geräten**

Die Umgebungen, in denen sich Mikroorganismen ansiedeln und Biofilme etablieren können, sind praktisch unbegrenzt. Für verschiedene im Folgenden beispielhaft aufgeführte medizinische Geräte konnte gezeigt werden, dass sie von Biofilm besiedelt werden (Costerton et al., 1999).

### **1.6.1. Herzklappenprothesen**

Derzeit werden zwei Gruppen von Herzklappenprothesen verwendet, zum einen mechanische Herzklappen, zum anderen Bioprothesen (Braunwald, 1997). Die Infektionsraten der prothetischen Klappenendokarditis oder der mikrobiellen Infektion der Klappe und auch des umliegenden Gewebes sind für beide Klappentypen ähnlich (Braunwald, 1997) und reichen von 0,5 % bis zu 4 % (Douglas, 1992, Hancock, 1994).

Die chirurgische Implantation der Herzklappenprothese führt zu Gewebeschäden, die zur Ansammlung von Thrombozyten und Fibrin an der Nahtstelle und übergreifend am implantierten Material führen. Dies bedingt eine größere Anfälligkeit für eine mikrobielle Besiedelung (Douglas, 1992).

Die ätiologischen Erreger sind durch Blutkultur zu identifizieren, es wird jedoch auch die transösophageale Echokardiografie zum Nachweis von Biofilm herangezogen (Douglas, 1992).

### **1.6.2. Zentralvenenkatheter**

Der Zentralvenenkatheter (ZVK) hat im Vergleich mit anderen medizinischen Produkten mit einer Infektionsrate zwischen 3 und 5 % das höchste Risiko einer gerätebedingten Infektion (Maki, 1994).

Rasterelektronenmikroskopische und Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten Biofilme sowohl auf der Außenseite des Katheters, als auch im Lumen (Raad et al., 1993).

Mikroorganismen, die den Katheter besiedeln, stammen entweder von der Hautkontaktstelle auf der Außenfläche des Produktes, oder bilden sich entlang des Lumens aufgrund von Manipulation des Katheters durch Gesundheitspersonal (Elliott et al., 1997, Raad, 1998).

Da der ZVK in direktem Kontakt mit dem Blutkreislauf steht, wird die Oberfläche mit Blutplättchen, Plasma und Gewebeproteinen wie Albumin, Fibrinogen, Fibronectin und Laminin beschichtet (Raad, 1998). Diese Produkte wirken als Konditionierungsfilm für Mikroorganismen, wie z.B. *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* (Raad, 1998). Die Kolonisierung und Biofilmbildung erfolgt innerhalb von 3 Tagen nach der Katheterisierung (Anaissie et al., 1995). Katheter, die weniger als 10 Tage gelegen hatten, neigten dazu, eine stärkere Biofilmbildung auf der äußeren Oberfläche des Katheters aufzuweisen. Bei längerfristigem Einsatz (> 30 Tage) waren hingegen die Biofilme im Lumen des Katheters deutlich ausgeprägter (Raad et al., 1993). Organismen die ZVK kolonisieren sind *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* und *Candida albicans* (Elliott et al., 1997, Raad, 1998).

### 1.6.3. Kontaktlinsen

Es gibt weiche Kontaktlinsen aus Hydrogel oder Silikon, die so konzipiert sind, dass Sauerstoff durch das Linsenmaterial diffundieren kann, um die Hornhaut zu versorgen und harte Kontaktlinsen aus Polymethylmethacrylat, bei denen durch das Blinzeln sauerstoffhaltige Tränenflüssigkeit unter die Linse fließt (Dart, 1996). Bakterien können an beide Arten von Linsen leicht anhaften (Miller u. Ahearn, 1987, Stapleton et al., 1993, Stapleton u. Dart, 1995, Dart, 1996).

Die Anhaftung an Kontaktlinsen wurde bisher für *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia spp.*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.* und *Candida spp.* beschrieben (Dart, 1996).

Bei einem Patient mit bakterieller Keratitis, ausgelöst durch *P. aeruginosa*, zeigten rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Kontaktlinse einen etablierten Biofilm, bestehend aus einer umfangreichen Exopolymermatrix (Stapleton u. Dart, 1995). In weiteren Versuchen wurden auf Kontaktlinsen von Patienten mit mikrobieller Keratitis ebenfalls Hinweise auf einen Biofilm gefunden. Dieser Biofilm enthielt verschiedene Arten von Bakterien oder sogar Bakterien und Pilze (McLaughlin-Borlace et al., 1998).

### 1.7. Kriterien Biofilm-assoziiierter Infektionen

Bei allen chronisch-rezidivierend verlaufenden Infektionen sollte zunächst von einer Biofilm-assoziierten Infektion ausgegangen werden (Hall-Stoodley et al., 2012). Die Biofilm-assoziierten Infektionen zeichnen sich hauptsächlich durch ihre progressive Pathologie, sowie ihre persistierende Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe der Biofilm-Infektion aus. Die Organfunktion und Lokalisation des betroffenen Gewebes beeinflussen weitere Symptome. Chronische Infektionen sind Folge der ineffektiven Antibiotika-Therapie und der unvollständigen Eliminierung der Erreger durch das Immunsystem (Høiby et al., 2010, Høiby et al., 2015) (s. Kap. II. 1.4. u. 1.5.).

Zum besseren Verständnis wurden Kriterien zur Bestimmung von Biofilm-assoziierten Infektionen definiert (Parsek u. Singh, 2003):

- 1) Anhaftung von infizierenden Bakterien an ein Substrat oder eine Oberfläche
- 2) Direkter Nachweis von Bakterien in Zellclustern oder Mikrokolonien, eingeschlossen in einer extrazellulären Matrix aus Bakterienkomponenten
- 3) Die Infektion ist auf eine bestimmte Lokalisation beschränkt
- 4) Die Infektion ist schwierig oder unmöglich mit Antibiotika zu eliminieren, trotz Sensibilität des planktonischen Gegenspielers gegenüber dem gleichen Antibiotikum

Später wurden zwei weitere Kriterien hinzugefügt (Hall-Stoodley u. Stoodley, 2009):

- 5) Kulturnegativität trotz starkem Verdacht auf einen Erreger
- 6) Hinweise auf ineffektive Wirtsclearance durch Nachweis von bakteriellen Mikrokolonien und Entzündungszellen in der Umgebung

## **1.8. Biofilm-assoziierte Infektionen beim Menschen**

Wie für viele medizinische Geräte konnte auch für einzelne Bakterien und für Bakterien im Zusammenhang mit chronischen Krankheiten gezeigt werden, dass die Bildung von Biofilm eine bedeutende Rolle spielt (Costerton et al., 1999).

### **1.8.1. Parodontitis**

Die Parodontitis reicht von leichten reversiblen Entzündungen des Zahnfleisches bis hin zur chronischen Zerstörung von Parodontalgewebe (Zahnfleisch, Parodontalband und Alveolarknochen). Die chronische Parodontitis kann bis zum Zerfall der Zähne führen (Lamont u. Jenkinson, 1998).

Im Falle der menschlichen Parodontalerkrankungen treten Bakterien als gemischte Populationen auf (Slots u. Genco, 1984). Diese Bakterien leben als komplexe Gemeinschaft an Oberflächen, die als Biofilm bezeichnet werden (Kolenbrander et al., 2002).

Unmittelbar nach der Reinigung der Zahnoberfläche bildet sich ein proteinhaltiger Film, ein sogenanntes Pellikel, auf den freiliegenden Zahnschmelzoberflächen in der Mundhöhle. Diese Pellikel bestehen u.a. aus Albumin, Lysozym, Glykoproteinen, Phosphoproteinen und Lipiden (Marsh u. Bradshaw, 1995). Innerhalb weniger Stunden besiedeln vor allem grampositive Kokken und stäbchenförmige Bakterien der normalen Mundflora, überwiegend Streptokokken, *Actinomyces* und eine kleinere Anzahl von *Haemophilus*, diese Oberfläche (Characklis u. Marshall, 1990). Diese Organismen haben die Fähigkeit, durch die Produktion von extrazellulären Glucanen direkt an die Pellikel zu binden (Kolenbrander u. London, 1993). Nach wenigen Tagen beginnen die Organismen mit der Produktion einer Polysaccharidmatrix und ein Biofilm beginnt sich zu entwickeln (Marsh u. Bradshaw, 1995).

### **1.8.2. Mukoviszidose**

Die Mukoviszidose (engl. *Cystic Fibrosis*, CF) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die mehrere Organe betrifft. In den meisten Fällen ist die Lunge am stärksten

involviert. Dies führt bei ca. 90 % der Patienten zum Tod (Reis u. Damaceno, 1998). Eine fehlerhafte Proteinregulation führt dazu, dass dicker muköser Schleim die Atemwege blockiert, was zu schweren Lungeninfektionen insbesondere mit *Pseudomonas aeruginosa* führen kann (Govan u. Deretic, 1996). Die Persistenz der Pseudomonaden in der Lunge von Patienten mit CF führt zum mukösen Phänotyp von *P. aeruginosa* (Koch u. Høiby, 1993). Lam und Mitarbeiter demonstrierten in Untersuchungen, dass dieser Schleim aus Polysacchariden besteht und später als Alginat identifiziert wurde (Lam et al., 1980). Das Sekret aus der Lunge von Patienten mit CF beinhaltet für gewöhnlich eine große Anzahl an neutrophilen Granulozyten. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die entzündlichen Abwehrmechanismen in der Lunge gegen die mukoiden Pseudomonaden von Granulozyten und Antikörpern dominiert werden (Mathee et al., 1999). Es stellt sich die Frage, warum mukoide *P. aeruginosa*-Infektionen so widerstandsfähig und resistent gegenüber der Immunabwehr sind. Hierfür fanden verschiedene Autoren heraus, dass der Biofilm die Bakterien vor antimikrobiellen Wirkstoffen und der Wirtsabwehr schützt (Koch u. Høiby, 1993, Høiby et al., 2010). Die Alginatschicht der mukoiden Stämme von *P. aeruginosa* scheint eine Art Abwehr für die AK darzustellen und blockiert dadurch die Phagozytose (Jensen et al., 1990, May et al., 1991, Jensen et al., 1992, Meluleni et al., 1995). Es wurde außerdem berichtet, dass der Biofilm von *P. aeruginosa* sehr resistent gegen Antibiotika ist und zu einer chronischen Entzündung und Schädigung des Lungengewebes bei Patienten mit CF führt (Aspe et al., 2012). Auch das Alter des Biofilms ist entscheidend für das Überleben von *P. aeruginosa*, da ältere Biofilme weniger anfällig gegen Antibiotika waren als jüngere Biofilme (Anwar et al., 1992).

Die erfolgreiche Behandlung einer CF hängt somit entscheidend von einer frühen antimikrobiellen Behandlung ab, um eine chronische Besiedelung der Lunge mit *P. aeruginosa* zu verhindern (Koch u. Høiby, 1993).

## **1.9. Biofilm bei Spirochaeten**

### **1.9.1. Treponema**

*Treponema denticola* ist ein Bakterium der Klasse *Spirochaetes* und ein wichtiger ätiologischer Vertreter der Parodontitis. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass *T. denticola* zusammen mit *Porphyromonas gingivalis*, ein Bakterium, welches bei aggressiven Formen der Parodontitis eine große Rolle spielt und meistens zum Zahnverlust führt, eine erhöhte Fähigkeit

zur Bildung von Biofilm und damit eine verlängerte Lebensfähigkeit zeigt (Vesey u. Kuramitsu, 2004).

### 1.9.2. Borrelien

Die Lyme-Borreliose ist eine Infektionskrankheit, die durch Spirochaeten der Gattung *Borrelia* verursacht wird und durch den Biss infizierter Zecken der Gattung *Ixodes* übertragen wird (Barbour u. Hayes, 1986). Patienten mit Lyme-Borreliose werden normalerweise mit verschiedenen Antibiotika behandelt, obwohl die Rezidivraten nach Absetzen der Antibiotikatherapie sehr hoch sind (Liegner et al., 1993, Dumler, 2001, Steere u. Angelis, 2006, Berndtson, 2013, Klempner et al., 2013).

Es wird vermutet, dass die Antibiotikaresistenz und die damit verbundene Rezidivneigung der Lyme-Borreliose auf die Bildung anderer morphologischer Formen von *Borrelia burgdorferi* zurückzuführen ist (Kurtti et al., 1987, Mursic et al., 1996, Brorson u. Brorson, 1998). *B. burgdorferi* zeigt, wie andere Spirochaeten, eine schraubenförmige bzw. korkenzieherartige Morphologie. In Gegenwart ungünstiger Umweltbedingungen, wie z.B. Nahrungsentzug, hohen pH-Werten, ungünstigen Temperaturen sowie antimikrobiellen Wirkstoffen, kann *B. burgdorferi* von der beweglichen Spirochaetenmorphologie in eine runde kugelähnliche Morphologie wechseln (Hampp, 1951, Alban et al., 2000, Gruntar et al., 2001, Brorson u. Brorson, 2004, Murgia u. Cinco, 2004, MacDonald, 2006, Miklossy et al., 2008). Neben dieser runden zystenähnlichen Form wurden auch Agglomerationen von Spirochaeten zu organisierten Aggregaten beobachtet (Barbour u. Hayes, 1986, Kurtti et al., 1987, Miklossy et al., 2008, Srivastava u. de Silva, 2009).

#### 1.9.2.1. Biofilm bei *Borrelia burgdorferi* in vitro

Die Persistenz von Spirochaeten in Gewebe, wie z.B. bei *B. burgdorferi* ist auf die Bildung von sog. “round bodies” oder auch Zysten, “Granula” bzw. “Kokkenkörper” zurückzuführen. Dieses Wachstum wird durch ungünstige Umgebungsbedingungen induziert. Die “round bodies” sind lebensfähig, wachsen und können sich unter günstigen Bedingungen wieder in motile Spirochaeten zurückverwandeln (Brorson et al., 2009).



In verschiedenen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit Antibiotika die Ausbildung zystischer Borrelien-Formen und biofilmähnlichen Kolonien induziert. Durch transmissionselektronische Untersuchungen konnten intakte Spirochaetenanteile in den Zysten nachgewiesen werden (Kersten et al., 1995, Sapi et al., 2011).

Antibiotika haben unterschiedliche Auswirkungen auf die verschiedenen morphologischen Formen von *B. burgdorferi*. Die Resistenz und das Wiederauftreten der Lyme-Borreliose steht im Zusammenhang mit verschiedenen morphologischen Formen, den sog. “round bodies” und biofilmähnlichen Kolonien. Daher ist die Wirkung von Antibiotika auf alle morphologischen Formen für eine wirksame Therapie der Lyme-Borreliose entscheidend. Die Persistenz lebensfähiger Organismen in den sog. “round bodies” und biofilmähnlichen Kolonien kann das Versagen der Antibiotikabehandlung und die dadurch anhaltenden Symptome der Lyme-Borreliose erklären (Sapi et al., 2011).

Die Biofilmbildung von *B. burgdorferi* sowie zwei weiteren *Borrelia*-Arten *in vitro* konnte durch die Bildung mikrobieller Gemeinschaften sowie die Ausbildung einer extrazellulären polymeren Matrix, die überwiegend aus Polysacchariden, Proteinen und Nukleinsäuren besteht, nachgewiesen werden (Sapi et al., 2012, Timmaraju et al., 2015).

#### **1.9.2.2. Biofilm bei *Borrelia burgdorferi* *in vivo***

Aufgrund der Beobachtungen der Biofilmbildung bei *B. burgdorferi in vitro*, lag es nahe, die Biofilmbildung auch *in vivo* nachzuweisen, um die Rolle der Überlebensstrategie in infiziertem Gewebe zu verstehen.

So wurden vor allem in Hautbiopsien von Patienten mit Borrelien-Lymphozytom sowohl einzelne Borrelien als auch Borrelien-Aggregate gefunden, die den *in vitro* gefundenen Borrelien-Aggregaten auffallend ähnlich sahen und als Biofilm identifiziert werden konnten. Somit konnte auch der Biofilm für *B. burgdorferi in vivo* gezeigt werden (Sapi et al., 2016).

### 1.9.3. Leptospiren

Im Jahr 2008 beobachteten Ristow und Coautoren zum ersten Mal die Biofilmbildung von Leptospiren *in vitro*. Die Bildung von Biofilm konnte sowohl bei apathogenen als auch bei pathogenen Leptospiren und bei verschiedenen Serovaren nachgewiesen werden (Ristow et al., 2008). Es konnte beobachtet werden, dass die Bakterien nach Anhaftung sowohl an einer Oberfläche als auch an Grenzflächen die Fähigkeit besaßen, Biofilm zu bilden. Hierbei zeigte sich, dass sich der Biofilm bei pathogenen Leptospiren (*L. interrogans*) langsamer entwickelt als bei apathogenen Leptospiren (*L. biflexa*) (Ristow et al., 2008).

Singh und Mitarbeiter untersuchten 2003 Biofilm in Zahnwassersystemen mit verschiedenen Methoden. Hierbei konnten sie verschiedene Bakteriengattungen nachweisen, die häufigste waren Spirochaeten der Gattung *Leptospira* (Singh et al., 2003). Die Bildung von Biofilm bei Leptospiren kann somit ein wichtiger Faktor beim Langzeitüberleben in Gewässern sein.

Leptospiren sind Organismen, die dafür bekannt sind im Boden und in Gewässern lange Zeit zu überleben. Durch Untersuchungen auf Reisfeldern, Abwasserkanälen und in stehendem Regenwasser konnte aquatischer Biofilm nachgewiesen werden. Mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) konnte DNA pathogener Leptospiren in dem gesammelten Biofilm nachgewiesen werden (Vinod Kumar et al., 2016).

Brihuega und Mitarbeiter konnten 2012 bei einem Feldisolat von *L. interrogans* Serovar Pomona, welches aus einem Schweinefötus isoliert wurde zeigen, dass Leptospiren zur Biofilmbildung fähig sind. Des Weiteren wurde die Biofilmbildung *in vivo* bei trächtigen Meerschweinchen getestet. Im Plazentagewebe der infizierten Meerschweinchen wurden lichtmikroskopisch Leptospiren-Aggregate gefunden, die mit der Bildung von Biofilm zusammenhingen (Brihuega et al., 2012).

Bei klinisch gesunden Nagetieren mit chronischer Leptospireninfektion der proximalen Nierentubuli konnte eine "biofilmartige" Struktur nachgewiesen werden, die die Leptospiren umgab (Yamaguchi et al., 2018).

## **2. Equine Rezidivierende Uveitis**

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU), auch heute noch geläufig als “periodische Augenentzündung” oder “Mondblindheit”, war in der Kaiserlichen Verordnung, betreffend die Hauptmängel und Gewährfristen beim Viehandel, vom 27. März 1899 und in der alten Fassung des deutschen Bürgerlichen Gesetzbuches unter den §§481 bis 492 einer der sechs aufgeführten Hauptgewährsmängel beim Pferd. Im Zuge der Schuldrechtsmodernisierung wurde diese Bestimmung zum 01. Januar 2002 hinfällig und für den Viehandel gilt seitdem dieselbe Gewährleistung wie für Sachen.

Dennoch spielt die Krankheit, mit großen Unterschieden in der Prävalenz zwischen 2 % und 25 %, je nach geografischer Lage (Witmer, 1954, Lavach, 1990, Schwink, 1992, Spiess, 1997, Szemes, 1999, Gilger u. Michau, 2004) eine große Rolle, da sie die häufigste Augenerkrankung der Pferdepopulation (Gerhards u. Wollanke, 2001) und die häufigste Ursache für eine Blindheit bei Pferden darstellt (Lavach, 1990, Keller u. Hendrix, 2005, Gilger u. Deeg, 2011).

### **2.1. Definition der ERU**

Die ERU ist definiert durch eine sero-fibrinöse und plasmazelluläre Entzündung. Sie betrifft Iris, Ziliarkörper, Choroidea und benachbarte Augenstrukturen. Die Krankheit verläuft chronisch-rezidivierend und die akuten Schübe gehen meist mit einer deutlichen Abwehrtrias einher. Durch eine progressive Zerstörung der Strukturen des inneren Auges kann die ERU zur Atrophie des Bulbus und schließlich zur Erblindung führen (Gerhards u. Wollanke, 2001, Gerhards u. Wollanke, 2006). Sie tritt sowohl ein- als auch beidseits auf, wobei sich die Angaben in der Literatur zur Häufigkeit des beidseitigen Auftretens zwischen 12 % und 30 % bewegen (Wollanke, 2002, Bartel, 2004, Wiehen, 2012, Kulbrock et al., 2013).

### **2.2. Ätiologie und Pathogenese der ERU**

Schon früher wurden verschiedene Ursachen für die ERU diskutiert. Zum einen stand die intraokulare Leptospireninfektion im Raum (Gsell et al., 1946, Rimpau, 1947, Hartwigk u.

Stoebbe, 1952, Witmer et al., 1953), zum anderen wurde eine Autoimmunreaktion vermutet (Morter et al., 1969, Rebhun, 1979, Gilger et al., 1999).

Durch die Entwicklung der Pars-Plana-Vitrektomie beim Pferd (Werry u. Gerhards, 1992) konnte man nun regelmäßig Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen erhalten und untersuchen und somit die Theorie der intraokularen Leptospireninfektion belegen (Brem et al., 1998, Wollanke et al., 1998, Brem et al., 1999, Faber et al., 2000, Wollanke et al., 2000, Wollanke et al., 2001, Niedermaier, 2002, Wollanke, 2002, Hartskeerl et al., 2004, Wollanke et al., 2004, Brandes et al., 2007, Loibl, 2009, Borstel et al., 2010, Spiess, 2010, Baake et al., 2016).

Der kulturelle Nachweis der Leptospiren aus Glaskörpermaterial erkrankter Pferde gelang in bis zu 53 % der Fälle, wohingegen der kulturelle Nachweis bei der Kontrollgruppe negativ verlief (Wollanke et al., 2004). Die PCR-Ergebnisse waren in > 70 % der Proben positiv (Wollanke et al., 2004) und auch die AK gegen Leptospiren konnten in erkrankten Augen zu ca. 90 % mit der Mikroagglutinationsreaktion (MAR) festgestellt werden (Wollanke, 2002).

Einige Autoren gehen davon aus, dass die Uveitis als eine Spätfolge einer Leptospireninfektion anzusehen ist (Gsell et al., 1946, Heusser, 1948, Yager et al., 1950, Heusser, 1952, Roberts et al., 1952, Selbitz, 2007, Malalana et al., 2015, RKI, 2015, Divers et al., 2019).

Die Blut-Augen-Schranke ist eine physiologische Barriere des Auges und trennt das immunprivilegierte innere Auge vom zirkulierenden Blut, um das Eindringen von zellulären und humoralen Entzündungszellen zu blockieren (Gilger u. Deeg, 2011, Coca-Prados, 2014). Diese kann durch diverse traumatische oder entzündliche Prozesse so zerstört werden, dass Bestandteile des Blutes sowie Zellen in das innere Auge gelangen können und somit auch Abwehrreaktionen in Form von immunkompetenten Zellen, sowie Antikörperproduktion wirtseigener und -fremder Antigene (Ag) im Auginneren die Folge sind (Wollanke, 2002, Gilger u. Deeg, 2011).

Vermutlich gelangen die Leptospiren durch ihre aktive Beweglichkeit während der akuten Leptospirämie über die Blut-Augen-Schranke in den Glaskörper und können dann intraokular persistieren. Diese Persistenz beruht auf der Vermutung, dass sich die Leptospiren mit wirtseigenem Protein umhüllen, sich intrazellulär aufhalten oder durch die morphologischen Veränderungen der äußeren Hülle nicht mehr vom Immunsystem erkannt werden können (Niedermaier, 2002, Wollanke, 2002, Gerhards u. Wollanke, 2006, Dahme u. Weiss, 2007).

Von einigen anderen Autoren wird die ERU als Autoimmunerkrankung eingestuft (Gilger et al., 1999, Deeg et al., 2001, Deeg et al., 2002, Deeg et al., 2004, Deeg et al., 2006, Deeg, 2008, Gilger, 2016). Sie wird den organspezifischen T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen zugeordnet, da CD4(+) T-Lymphozyten in allen Stadien der ERU nachgewiesen werden konnten (Deeg et al., 2002).

Immunreaktionen von Pferden richten sich gegen die Hauptautoantigene der Netzhaut, das S-Antigen (S-Ag) (Wacker et al., 1977, Caspi et al., 1988) und *interphotoreceptor retinoid-binding protein* (IRBP) (Gery et al., 1986, Caspi et al., 1988). In einer Studie wurde der Glaskörper vitrektomierter Pferde auf das Vorhandensein von Immunglobulin G (IgG) AK gegen S-Ag und IRBP untersucht. In diesen Proben konnten autoreaktive T-Zellen, sowie in über 70 % IgG-AK gegen S-Ag und/oder IRBP nachgewiesen werden, welche spezifisch für retinale Ag sind (Deeg et al., 2001). Das Vorhandensein von Leptospiren-Ag oder Leptospiren-AK wurde bei diesen Untersuchungen jedoch nicht berücksichtigt. Die von Deeg und Mitarbeitern verwendeten, durch Pars-Plana-Vitrektomie gewonnenen Proben waren identisch mit denen, die für Untersuchungen auf das Vorhandensein von Leptospireninfektionen untersucht worden waren und die ganz überwiegend positiv getestet worden waren (Nachweise von AK gegen Leptospiren in den Proben und positive Kulturergebnisse mit den Glaskörperproben) (Wollanke et al., 1998, Wollanke et al., 1998, Brem et al., 1999, Wollanke et al., 2000, Wollanke et al., 2001, Wollanke, 2002).

In einem weiteren Versuch wurde durch eine subkutane Injektion von IRBP bei Pferden eine ERU-ähnliche Krankheit ausgelöst. Jedoch konnten Rezidive nur durch wiederholte IRBP-Injektionen ausgelöst werden (Deeg et al., 2002). Damit war die Frage der spontanen Rezidive, wie sie im Fall der ERU auftreten, noch nicht geklärt und die These der Autoimmunerkrankung nicht belegt. Okulare Autoimmunreaktionen, wie sie von Deeg und Mitarbeitern nachgewiesen wurden, treten hingegen oft infektionsassoziiert oder auch als Traumafolge auf (Whitcup, 1997).

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie konnten Leptospiren im Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden gezeigt werden (Niedermaier, 2002, Brandes et al., 2007). Durch positive PCR Ergebnisse auf Leptospiren-Ag und positive MAR Ergebnisse auf Leptospiren-AK derselben Probe, konnten diese Ergebnisse untermauert werden. Da in derselben Glaskörperprobe sowohl Leptospiren-Ag, als auch AK gegen Leptospiren nachgewiesen werden konnten, ist es offenkundig so, dass die AK nicht alle Leptospiren beseitigen können.

Möglicherweise spielt auch hier die Biofilm-Produktion beim “Verstecken” von Bakterien vor dem Immunsystem eine große Rolle, wie sie schon für verschiedene Bakterien beschrieben wurde (s. Kap. II. 1.6, 1.8, 1.9).

### **2.3. Klinisch-ophthalmologische Symptome der ERU**

Mithilfe der betroffenen anatomischen Strukturen lässt sich die ERU in folgende Gruppen einteilen (Gerhards u. Wollanke, 2001) (Wollanke et al., 2004):

- Vordere Uveitis (Iritis bzw. Iridozyklitis)
- Intermediäre Uveitis (Zyklitis)
- Hintere Uveitis (Chorioiditis)
- Panuveitis

Die Symptome der ERU stellen sich in sehr unterschiedlichen Ausprägungen dar (Spiess, 1997). Sie können von klinisch unauffällig, über geringgradige Ausprägung, zu hochgradigen Schmerzen mit Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens führen (Gerhards u. Wollanke, 2001). Zur besseren Übersicht werden die Symptome nach Verlaufsform in ein akutes und das sich anschließende chronische Stadium unterteilt (Witmer et al., 1953, Rebhun, 1979, Spiess, 1997, Gerhards u. Wollanke, 2001, Wollanke, 2002, Gilger u. Michau, 2004, Gerhards u. Wollanke, 2006, Gilger u. Deeg, 2011).

Akute Uveitis:

- Abwehrtrias (Photophobie, Blepharospasmus, Epiphora)
- Ödematöse Lidschwellung
- Enophthalmus
- Konjunktivitis
- Diffus, hauchig getrübe Hornhaut
- Perilimbale, büstensaumartige Vaskularisation der Hornhaut (nach 2-3 Tagen)
- Exsudation in die vordere Augenkammer (serös, fibrinös, haemorrhagisch)
- Miosis
- Rubeosis iridis
- Diffuse Glaskörpertrübung

Dieser akute Zustand des Entzündungsschubes kann bis zu 3 Wochen anhalten (Gerhards u. Wollanke, 2001). Im weiteren Krankheitsverlauf entstehen irreversible Veränderungen.

Chronisch-rezidivierende Uveitis:

- Atrophia bulbi bis hin zu Phthisis bulbi
- Vordere Synechie
- Hintere Synechie
- Irisresiduen auf der Linsenvorderfläche
- Bläschenförmige Katarakt
- Präzipitate auf Vorder- und Rückfläche der Linse mit einsetzender Linsentrübung bis hin zur maturen Katarakt
- Luxation oder Subluxation der Linse
- Glaskörperverflüssigung
- Zunehmende Glaskörpertrübung
- Zunehmende Glaskörpereinlagerungen
- Partielle oder totale Ablatio retinae
- Chorioretinitische Narben
- Sekundärglaukom (selten)

Bei einer ERU im Endstadium, mit nicht wiederherzustellender Sehfähigkeit durch Netzhautablösung, hochgradige Bulbusatrophy und chronischer Reizung des Auges ist die Bulbusexstirpation indiziert (Gerhards u. Wollanke, 2001).

## **2.4. Diagnose der ERU**

Erste Hinweise für die Diagnose “ERU” kann man durch eine gründliche Anamneseerhebung, unter anderem durch das rezidivierende Geschehen, durch die ophthalmologische Untersuchung, durch das Vorhandensein klinischer Symptome im akuten Entzündungszustand, oder durch Befunde am betroffenen Auge, die auf vorangegangene Uveitisschübe hindeuten erhalten (Wollanke, 2002, Gilger u. Michau, 2004, Gerhards u. Wollanke, 2006).

Kann hierdurch noch keine sichere Diagnose gestellt werden, gibt es die Möglichkeit eine Punktion der vorderen Augenkammer des betroffenen Auges durchzuführen, um eine Kammerwasserprobe zu erhalten. Mit der gewonnenen Probe kann durch verschiedene Labortests das Vorhandensein einer leptospirenbedingten Uveitis bestätigt werden (Wollanke, 2002).

Mit dieser Kammerwasserprobe kann mittels MAR oder ELISA auf das Vorhandensein von AK gegen Leptospiren und mittels PCR auf Leptospiren-Ag getestet werden. Durch ein positives Ergebnis von mindestens einem dieser Tests, ist die intraokulare Leptospireninfektion bestätigt und die Diagnose der ERU gesichert (Wollanke, 2002, Gesell, 2004, Wollanke et al., 2004, Wollanke et al., 2018).

Serumuntersuchungen konnten in der Vergangenheit dagegen keine eindeutigen Hinweise für die Diagnose der ERU liefern, da sie zu unspezifisch waren. In Seren sowohl von augengesunden Pferden als auch von an ERU erkrankten Pferden waren Antikörpertiter mittels MAR feststellbar. Es bestand hierbei kein signifikanter Unterschied für Vorkommen und Höhe der mittels MAR bestimmten Antikörpertiter gegen Leptospiren. Bei 9,5 % der Pferde, bei denen die Kultivierung der Leptospiren aus dem Auge positiv war, konnten keine Antikörpertiter mittels MAR im Serum nachgewiesen werden und in über 80 % der Seren augengesunder Pferde konnten in manchen Untersuchungen Antikörpertiter gegen Leptospiren mittels MAR nachgewiesen werden. Serumuntersuchungen allein sind somit für die Bestimmung einer leptospirenbedingten Uveitis beim Einzeltier zu ungenau, da zu viele augengesunde Pferde agglutinierende Antikörper im Serum aufweisen (Wollanke et al., 1998, Wollanke et al., 1998, Wollanke et al., 2000, Wollanke, 2002, Wollanke et al., 2004).



## 2.5. Therapie der ERU

Im akuten Krankheitsstadium ist eine umgehende und intensive konservative Therapie durch symptomatische Behandlung, die eine Weitstellung der Pupille, eine Schmerzlinderung und ein Zurückdrängen der intraokularen Entzündung zum Ziel hat, ausschlaggebend. Dadurch soll die Entzündung im inneren Auge gestoppt werden, um die Schäden möglichst gering zu halten (Gerhards u. Wollanke, 2001).

Die konservative Therapie besteht zum einen aus der Weitstellung der Pupille, durch die lokale Verabreichung von Mydriatika und Zyklopletika, wie z.B. dem Parasympatholytikum Atropin. Besteht bereits eine vordere oder hintere Synechie (Verklebung der Iris mit dem Hornhautendothel oder der Linsenvorderfläche) oder ist eine lokale Behandlung nicht möglich, kann auf eine subkonjunktivale Injektion mit pupillenerweiternden Wirkstoffen, eine sog. "Sprengspritze" zurückgegriffen werden (Lavach, 1990, Schwink, 1992, Gerhards u. Wollanke, 2001).

Des Weiteren kommen lokal glukokortikoidhaltige Präparate und systemisch die Gabe von nicht-steroidalen Antiphlogistika (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDs), wie z.B. Flunixin-Meglumin oder Phenylbutazon zum Einsatz. Es können im Einzelfall jedoch auch Glukokortikoide systemisch verabreicht werden (cave: Pododermatitis aseptica diffusa) (Rebhun, 1979, Spiess, 1997, Gerhards u. Wollanke, 2001, Gilger u. Michau, 2004, Gerhards u. Wollanke, 2006, Gilger u. Deeg, 2011).

Durch die konservative Therapie können jedoch weitere Entzündungsschübe nicht vermieden und die Erblindung des erkrankten Auges nicht abgewehrt werden. Die chronisch rezidivierenden Verläufe können mit einer Glaskörperspülung, der subtotalen trans-Pars-plana-Vitrektomie nach Werry und Gerhards, speziell entwickelt für das Pferd im Jahre 1991, verhindert werden (Werry u. Gerhards, 1992).

Durch die Entfernung des Glaskörpers und den für die rezidivierenden Entzündungen ursächlichen Leptospiren, kann eine Rezidivfreiheit von 98 % erreicht werden (Frühauf et al., 1998, Gerhards et al., 1998, Gerhards et al., 1999), um somit dem drohenden Sehverlust entgegen zu wirken (Gerhards u. Wollanke, 2001, Schinagl, 2017).

Ein weiterer Ansatz zur Therapie der ERU ist ein suprachoroidal eingesetztes Implantat, welches kontinuierlich den enthaltenen Wirkstoff Cyclosporin A freisetzt und durch die lokale Immunsuppression die Entzündungsschübe verhindern soll (Keller u. Hendrix, 2005). Es

werden jedoch lediglich vorübergehend (2 – 3 Jahre lang) abgeschwächte und zeitlich begrenztere Entzündungsschübe als vor der Implantation beobachtet, die eventuell den Verlust der Sehfähigkeit lediglich verzögern (Gilger u. Michau, 2004, Gilger et al., 2006, Gilger u. Deeg, 2011).

Ebenso wird die intravitreale Injektion von Gentamicin bei wiederkehrender oder anhaltender Uveitis als weiterer Therapieansatz diskutiert (Fischer et al., 2019). Bei 88,1 % der Pferde nach vitrealer Gentamicin-Injektion konnten Kontrolluntersuchungen über einen Zeitraum von mindestens 30 Tagen erfolgen. In 8,5 % der Fälle konnte eine wiederkehrende Entzündung und in 3,4 % eine anhaltende Entzündung beobachtet werden. Zu beachten ist jedoch die Tatsache, dass nur bei 90 % der therapierten Pferde eine PCR auf Leptospiren-Ag durchgeführt wurde und in lediglich 29,1 % der Proben ein positives Ergebnis erzielt wurde. Demnach wurde diese Art der Therapie nicht nur bei leptospirenbedingter Uveitis, sondern offenbar auch bei Uveitiden anderer Genese durchgeführt und stellt somit keinen direkten Vergleich dar. Hinzu kommt, dass der Beobachtungszeitraum nach der Injektion verhältnismäßig kurz war und noch keine Langzeitergebnisse vorliegen.

### **3. Leptospiren**

#### **3.1. Taxonomie und Morphologie**

Die Gattung *Leptospira* gehört zur Familie der Leptospiraceae in der Klasse der Spirochäten. Die Taxonomie innerhalb der Gattung *Leptospira* wurde mehrfach neu geordnet. Früher wurde zwischen der pathogenen Spezies *Leptospira interrogans* sensu lato und der saprophytär lebenden Spezies *Leptospira biflexa* sensu lato unterschieden, welche aufgrund ihrer antigenen Eigenschaften in mehrere Serovare unterteilt werden. Die Spezies *L. interrogans* umfasste mehr als 50 Serovare, welche in 25 Serogruppen eingeteilt wurden. Nach der neuen Nomenklatur werden derzeit 21 verschiedene Genomspezies mit neu klassifizierten Serovaren unterschieden, von denen 14 pathogene Eigenschaften aufweisen. Die ehemalige Einteilung findet immer noch hauptsächlich bei Klinikern, Epidemiologen und im allgemeinen Sprachgebrauch Verwendung (RKI, 2015, OIE, 2021).

Leptospiren sind gram-negative Bakterien mit einem Durchmesser von 0,1 - 0,2  $\mu\text{m}$  und einer Länge von 6 - 20  $\mu\text{m}$  (Canale-Parola, 1978, Faine et al., 2000). Es handelt sich um schraubenförmige, bewegliche Bakterien mit ihren unverwechselbaren hakenförmigen Enden an einer oder beiden Seiten (Farr, 1995, Faine et al., 2000, Levett, 2001). Leptospiren haben eine typische Doppelmembranstruktur, bei der die zytoplasmatische Membran und die Peptidoglykan-Zellwand eng miteinander verbunden sind und von einer äußeren Membran überlagert werden (Haake, 2000, Cullen et al., 2004). Ein schraubenförmiger Zellzylinder und zwei periplasmatische Flagellen sind verantwortlich für die Beweglichkeit und ermöglichen den Leptospiren, in Gewebe einzudringen (Goldstein u. Charon, 1988, Farr, 1995, Adler u. de la Peña Moctezuma, 2010).

### **3.2. Epidemiologie**

Tiere, die sich von einer Leptospirose erholen, können zu asymptomatischen Trägern werden, die über längere Zeiträume infektiöse Leptospiren in den proximalen Nierentubuli beherbergen (Levett, 2001). Als ein großes Reservoir dienen kleine Nager, wie z.B. Mäuse und Ratten, für die jeweils wirtsangepassten Serovare. Typisch für diese Tiere sind geringe Antikörperreaktionen und niedrige Gewebsbelastung. Sie beherbergen aber vitale Leptospiren in den Nieren oder dem Genitaltrakt und werden so zu einer wichtigen Infektionsquelle für Mensch und Tier (Bharti et al., 2003, Cibulski, 2016, Cibulski u. Wollanke, 2016).

Über die Nieren werden die Leptospiren mit dem Urin ausgeschieden und somit kommt es zur Kontamination von Böden, stehenden Gewässern, Bächen und Flüssen. Infektionen von Tieren oder Menschen entstehen durch direkten Kontakt mit Urin oder indirekt durch kontaminiertes Wasser (Faine et al., 2000, Levett, 2001, Bharti et al., 2003).

Leptospiren gelangen durch kleine Schnitte oder Abschürfungen der Haut, sowie über Schleimhäute, wie z.B. die Bindehaut in die Blutbahn, können sich so in sämtlichen Organen einnisten und es kommt dort zur Vermehrung der Erreger (Hanson, 1982, Thiermann, 1984, Selbitz, 2007). Der Verlauf der Infektion hängt von der Pathogenität der jeweiligen Serovar bzw. Serovare und der Immunantwort des Wirtes ab (Bernard, 1993). Durch die Fähigkeit die Plazenta zu passieren, kann es zum spontanen Abort kommen (Coghlan u. Bain, 1969, Faine et al., 1984, Faine et al., 2000, Bharti et al., 2003).

### 3.3. Leptospirose beim Menschen

Leptospirose ist eine weltweit verbreitete zoonotische, bakterielle Erkrankung, die Menschen, Wildtiere und Haustiere betrifft (Hanson, 1982, Thiermann, 1984, Songer u. Thiermann, 1988, Krauss, 2004, Brem u. Schönberg, 2009, RKI, 2015, Weis et al., 2017, Schafbauer et al., 2019, Yupiana et al., 2020). Beim Menschen ist die Leptospirose immer durch eine tierische Quelle erworben, die Mensch zu Mensch Übertragung ist praktisch nicht existent (Adler u. de la Peña Moctezuma, 2010). Die Häufigkeit menschlicher Infektionen ist in den Tropen höher als in gemäßigten Regionen (Levett, 2001). Die Übertragung erfolgt jedoch sowohl in Industrie- als auch in Entwicklungsländern (Bharti et al., 2003). Eine Infektion des Menschen resultiert aus der Exposition mit infiziertem Urin von sog. „Trägartieren“, entweder direkt oder durch Kontamination von Boden und Wasser (WHO, 1999, Levett, 2001, Bharti et al., 2003). Früher, in manchen Ländern auch heute noch, wurde die Leptospirose in erster Linie als Berufskrankheit angesehen, die mit Aktivitäten wie Bergbau, Kanalstandhaltung, Viehzucht und Schlachtung, Tiermedizin und Militärmanövern verbunden war (Krauss, 2004, Brem u. Schönberg, 2009, Yupiana et al., 2020). Die Bedeutung solcher Berufsrisiken hat jedoch seit der Einführung von Schutzmaßnahmen immer mehr abgenommen und viele Fälle treten heute in Entwicklungsländern im Zusammenhang mit dem Leben in Slums auf (Vinetz et al., 1996, Ko et al., 1999).

Das Krankheitsbild der Leptospirose, erstmals beschrieben von Weil im Jahr 1886, zeigt sich klassisch mit einem zweiphasigen Verlauf (Brem u. Schönberg, 2009). Die akute, leptospirämische Phase, beschrieben mit einer Dauer von ca. 4 - 7 Tagen zeigt sich mit Symptomen wie z.B. Schüttelfrost, plötzlichem hohem Fieber, Übelkeit, Erbrechen und Kopfschmerzen (Schönberg, 1984, Krauss, 2004, Brem u. Schönberg, 2009), während die zweite Phase zu unterschiedlichen Organmanifestationen z.B. in der Leber, den proximalen Nierentubuli, dem Herzen, im Auge sowie im Zentralnervensystem führen kann (Babudieri, 1958, Thiermann, 1984, Levett, 2001, Krauss, 2004, Selbitz, 2007). Die Schwere der Leptospirose und Ausprägung der klinischen Symptome beim Menschen kann jedoch je nach infizierende Serovar (Ellis et al., 1986, Bernard, 1993, Grooms, 2006), dem Alter, dem Gesundheitszustand und der immunologischen Kompetenz des Patienten stark variieren (Faine et al., 2000, Levett, 2001, Bharti et al., 2003).

### **3.4. Leptospireninfektion beim Pferd**

Bei diversen epidemiologischen Studien in verschiedenen geografischen Lagen gibt es enorme Unterschiede in Inzidenz und Seroprävalenz, sowie große Unterschiede der beteiligten Serovare (Båverud et al., 2009, Jung et al., 2010, Houwers et al., 2011, Ebani et al., 2012, Hamond et al., 2012, Hamond et al., 2013).

In den meisten Fällen verläuft die systemische Leptospirose bei Pferden inapparent und bleibt unerkannt (Morter et al., 1969, Roberts, 1969, Schwink, 1992, Krauss, 2004). Zu den milden Verlaufsformen gehören Fieber, Lustlosigkeit und Anorexie (Morter et al., 1969). Bei schwerwiegenden Verlaufsformen treten eine Reihe typischer Anzeichen auf, wie z.B. Bindehautentzündungen, Ikterus, Anämie, petechiale Blutungen auf der Schleimhaut und allgemeine Depression bis hin zum Tod (Morter et al., 1969, Roberts, 1969, Schwink, 1992, Krauss, 2004). Insbesondere bei Fohlen kann es auch zu Nierenversagen kommen (Verma et al., 2013).

### **3.5. Intraokulare Leptospireninfektion und Uveitis beim Pferd**

Da sich systemische Leptospirosen beim Menschen unter anderem auch durch Uveitisschübe gezeigt haben (Weil, 1886, Gsell et al., 1946, Hanno u. Cleveland, 1949, Rathinam u. Namperumalsamy, 2009), wurde auch bei Pferden mit einer Uveitis ein Zusammenhang vermutet (Rimpau, 1947, Heusser, 1948, Halliwell et al., 1985, Davidson et al., 1987).

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl experimentelle als auch natürliche Infektionen mit Leptospiren 12 bis 24 Monate nach der Infektion zu einer klinischen Uveitis geführt haben (Heusser, 1952, Morter et al., 1964, Morter et al., 1969, Williams et al., 1971). Heute ist bekannt, dass sich sowohl bei Menschen als auch bei Pferden nach vielen Jahren eine ein- oder beidseitige Uveitis nach der Primärinfektion als Spätfolge einer Leptospirose entwickeln kann (RKI, 2015).

Außerdem gelang sogar der kulturelle Nachweis von Leptospiren aus dem Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden (Brem et al., 1998, Brem et al., 1999, Faber et al., 2000, Hartskeerl et al., 2004, Wollanke et al., 2004).

Das Auftreten von AK gegen Leptospiren konnte in einer umfassenden Studie in 90 % der intraokularen Glaskörperproben festgestellt werden (Wollanke et al., 2004). Somit konnte bewiesen werden, dass die Erreger nach hämatogener Infektion die Blut-Augen-Schranke überwinden, im Glaskörper persistieren und dort die AK-Bildung stattfindet (Witmer et al., 1953, Davidson et al., 1987).

Obwohl sehr hohe AK-Titer im Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden nachgewiesen wurden, konnten mit diesen Glaskörperproben gleichzeitig positive Kulturergebnisse erzielt (Wollanke, 2002) und in elektronenmikroskopischen Untersuchungen derselben Proben phagozytierte Leptospiren dargestellt werden (Brandes et al., 2007). Schon früher wurden in denselben Glaskörperproben sowohl Antikörper gegen Leptospiren als auch vermehrungsfähige Leptospiren in der Kultur nachgewiesen (Brem et al., 1998, Brem et al., 1999). Der Grund dafür ist noch nicht vollständig geklärt, es wird jedoch vermutet, dass sich der Erreger intrazellulär schützen kann und somit sein Überleben gesichert ist (Gerhards u. Wollanke, 2006), andere Autoren beschreiben eine Tarnung durch wirtseigenes Protein (Faine et al., 2000). Solch eine „Hülle“ konnte durch elektronenmikroskopische Darstellungen von Glaskörperproben gezeigt werden (Niedermaier, 2002, Niedermaier et al., 2006, Brandes et al., 2007).

### **3.6. Labordiagnostik auf eine Leptospireninfektion**

#### **3.6.1. Indirekter Nachweis**

Der serologische Nachweis mittels AK-Diagnostik spielt bei der Leptospirose eine große Rolle. Im Blut können ab dem fünften bis neunten Tag nach dem Auftreten klinischer Symptome AK nachgewiesen werden (Levett, 2001, Krauss, 2004). Aber auch Urin, Milch und Liquor, sowie Nieren- und Lebergewebe kommen hierfür in Frage (Babudieri, 1961, Kayser et al., 2010).

##### **3.6.1.1. Mikroagglutinationsreaktion (MAR)**

Die MAR ist das Standardverfahren zum serologischen Nachweis von AK gegen Leptospiren (Thiermann, 1984, Schwink, 1992, Bernard, 1993, Farr, 1995, Krauss, 2004, Kayser et al.,

2010) oder zur Spezifität der Agglutination verschiedener Serovare mit Immunseren zum Zweck der Identifizierung (Faine et al., 2000).

Als Antigensuspension werden lebende Kulturen der späten logarithmischen oder frühen stationären Wachstumsphase von Leptospiren verwendet, die 4 bis 14 Tage in flüssigen Medien bei 28 °C bis 30 °C gezüchtet wurden. Die bevorzugte Dichte an Leptospiren liegt bei  $1 - 2 \times 10^8$  Leptospiren pro ml. Zudem ist es ratsam, lokal isolierte Ag-authentifizierte Stämme zu verwenden, um eine hohe Sensitivität sicher zu stellen (Faine et al., 2000, Levett, 2001, Kayser et al., 2010).

Die Ag-Suspension wird mit einer Verdünnung des Patientenserums auf eine Mikrotiterplatte verbracht, durch schwenkende Bewegungen vermischt, für 2-4 Stunden bei Raumtemperatur oder 30 °C inkubiert und mit Hilfe der Dunkelfeldmikroskopie auf Agglutination untersucht. Der Endpunkt ist eine Verdünnung, bei der eine Agglutination der Leptospiren von 50 % verzeichnet wird, gemessen durch den Vergleich mit der Dichte von nichtagglutinierten Leptospiren einer Kontrollsuspension (Levett, 2001, Brem u. Schönberg, 2009).

Die MAR besitzt sowohl eine sehr hohe Sensitivität als auch Spezifität. Die AK-Titer sind nach einer Infektion über Monate sehr hoch, daher kann ein sehr niedriger Titer ein Hinweis auf eine bereits lang vergangene Infektion sein (Bernard, 1993). Bei einem negativen MAR-Ergebnis im Rahmen einer akuten Infektion könnte die Probenentnahme an einem zu frühen Zeitpunkt erfolgt sein, bevor spezifische AK gebildet wurden (Levett, 2001) oder die Immunreaktion des Organismus auf das auslösende Ag fiel zu schwach aus (Thiermann, 1984).

Für den Nachweis einer akuten Leptospireninfektion ist eine Serokonversion (mindestens 4-facher Titeranstieg) beweisend (Faine et al., 2000, RKI, 2015).

### **3.6.1.2. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)**

Der Hauptvorteil des ELISAs ist die Tatsache, dass er Informationen über den Isotyp des Antikörpers, sprich IgG oder IgM liefern kann, der mit dem leptospiralen Ag reagiert. Dies ist nützlich, um herauszufinden, ob der im Serum vorhandene AK des Patienten von einer akuten Infektion stammen oder das Resultat von früheren Infektionen ist (Adler et al., 1980, Cousins et al., 1985, Chapman et al., 1988, Bercovich et al., 1990, Woodward et al., 1997). Zudem

kommt dem IgA-Nachweis als Hinweis auf chronische lokale Infektionen eine große Bedeutung zu (Loibl, 2009, Loibl et al., 2018).

### **3.6.2. Direkter Nachweis**

Der direkte Nachweis durch die Anzucht der Leptospiren aus Körperflüssigkeiten oder Gewebe bzw. der Nachweis leptospiraler DNA in der PCR ist die sensitivste Methode zum Nachweis von Leptospiren (RKI, 2015). Leptospiren sollten für den direkten Nachweis aus dem Blut innerhalb weniger Tage im akuten Krankheitsstadium (Fieberphase) entnommen werden, da der Nachweis vermehrungsfähiger Leptospiren zu einem späteren Zeitpunkt möglicherweise nicht mehr gegeben ist (Levett, 2001). Demnach sollte ab der zweiten Krankheitswoche betroffenes Gewebe oder Urin für die Untersuchungen herangezogen werden (Brem u. Schönberg, 2009).

#### **3.6.2.1. Mikroskopischer Nachweis**

Für den direkten mikroskopischen Nachweis eignet sich am besten die Dunkelfeldmikroskopie mit einer 200- bis 250-fachen Vergrößerung für eine scharfe Abbildung (Brem u. Schönberg, 2009). Für die Diagnosestellung ist darauf zu achten, entsprechend dem Krankheitsstadium angemessenes Material zu verwenden, da die Erreger nur in geringen Mengen vorliegen und typischerweise schwer auffindbar sind (Schönberg, 1984). Die Phasenkontrastmikroskopie ist ebenfalls geeignet zur mikroskopischen Darstellung der Leptospiren ebenso wie der mikroskopische Nachweis in Gewebeschnitten mit Hilfe geeigneter Färbemethoden (Straubinger, 2015).

##### **3.6.2.1.1. Elektronenmikroskopischer Nachweis**

Die Elektronenmikroskopie von Leptospiren wird hauptsächlich für die Darstellung der Morphologie von strukturellen Komponenten durchgeführt (Ritchie u. Ellinghausen, 1965, Birch-Andersen et al., 1973, Hovind-Hougen, 1981, Faine et al., 2000).



Es existieren zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen von experimentell infizierten Tieren zur Darstellung von Leptospiren mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (Miller u. Wilson, 1962, Cheville et al., 1980, Williams et al., 1981).

### **3.6.2.2. Kultureller Nachweis**

Wichtig für den kulturellen Nachweis ist, dass geeignetes und dem Krankheitsbild entsprechendes Probenmaterial verwendet wird. So können unter anderem Blut, Liquor, Urin und Gewebe für die Anzucht herangezogen werden (Bernard, 1993, Farr, 1995, Levett, 2001). Blut und Liquor sollten demnach in der ersten Woche nach Erkrankungsbeginn, Urin in der zweiten Erkrankungswoche herangezogen werden (RKI, 2015). Mit einer Verdopplungszeit von ca. 8 Stunden vermehren sich Leptospiren in der Kultur nur sehr langsam, was den Nachweis grundlegend kompliziert und langwierig gestaltet (RKI, 2015).

Für die Differenzierung der isolierten Leptospiren in die jeweilige Serogruppe, bzw. das Serovar kommen entweder die bereits beschriebenen serologischen Methoden und monoklonale Antikörper zum Einsatz (Levett, 2001, Hartskeerl et al., 2004) oder auch aktuell noch sehr teure molekulargenetische Typisierungen in Frage (Allan et al., 2020).

### **3.6.2.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Durch die Entwicklung einer quantitativen real-time PCR ist dies eine anerkannte Methode, da die entwickelten LipL32-Primer ausschließlich DNA pathogener Leptospiren nachweisen und dabei jede Genospezies erkennen können (Roczek, 2008).

Von Vorteil ist die hohe Sensitivität bei minimalem Zeitaufwand (Roczek, 2008) und die geringe Probenmenge, die benötigt wird (Bodaghi u. LeHoang, 2002). Jedoch muss für die Bestimmung der Serovare wieder auf weitere Tests zurückgegriffen werden, da die PCR keine Serovar-Differenzierung ermöglicht (Levett, 2001). Für eine Serovar-Differenzierung müssen spezifischere Methoden verwendet werden, z.B. Multilocus Sequence Typing (MLST) (Rettinger et al., 2012, Varni et al., 2018, Cilia et al., 2020).

### **3.6.2.4. Immunhistochemische Färbung**

Durch die Immunhistochemie (IHC) kann eine sehr geringe Anzahl von Leptospiren spezifisch nachgewiesen werden und gleichzeitig können einzelne Serovare bestimmt werden (Faine et al., 2000). Die immunhistochemische Untersuchungsmethode findet sowohl für Gewebe als auch für Flüssigkeiten Anwendung, wobei auch tote Leptospiren im vorhandenen Material detektiert werden können (Palmer, 1988, Faine et al., 2000). Die IHC wird jedoch häufiger mit Gewebeschnitten durchgeführt (sowohl mit menschlichem als auch tierischem Gewebe) (Wild et al., 2002, Iglezias et al., 2020). Die IHC ist eine häufig verwendete spezifische Nachweismethode für leptospirales Antigen in verschiedenen Gewebeproben und Spezies (Saglam et al., 2008, Santos et al., 2015, Almeida et al., 2019). An Nierengewebe vom Hund konnte durch Färbung mit spezifischen Leptospiren-Antigenen gezeigt werden, dass die IHC eine geeignete Methode ist, um Leptospirose beim Hund zu diagnostizieren (Wild et al., 2002).

### **3.6.2.5. Silberimprägnierung**

Leptospiren sind mit den üblichen Bakterienfärbungen schwer anzufärben (Blenden u. Goldberg, 1965), die Silberimprägnierung stellt jedoch eine geeignete Methode dar, um Spirochaeten sichtbar zu machen. Der Nachweis gelingt sowohl mit Ausstrichen auf Objektträgern (Babudieri, 1961), in Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe (Skilbeck u. Chappel, 1987), sowie bei histologischen Schnitten (Faulkner u. Lilue, 1945). Es sind schon verschiedene Protokolle mit jeweiligen Modifikationen beschrieben worden, wie z.B. die Silberimprägnierung nach Fontana, die Methode von Levaditi (Babudieri, 1961) und die Färbung nach Warthin-Starry (Faulkner u. Lilue, 1945).

Der Hauptvorteil dieser Methode ist der geringe Kostenaufwand und die direkte Visualisierung von Bakterien in der Probe. Dies konnte in einer Studie gezeigt werden, in der Leptospiren in Nierengewebe von Rindern mit Leptospirose bei knapp 70 % der Proben durch die Warthin-Starry Silberimprägnierung sichtbar gemacht werden konnten. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass bei geringer Leptospirenlast die Bakterien häufig unentdeckt bleiben und damit möglicherweise falsch negative Ergebnisse die Folge sind (Azizi et al., 2014). Daher kommen zum Beispiel auch die Kombination von IHC und Warthin-Starry Silberimprägnierung zum Einsatz (Zilber et al., 2016).

### **3.6.3. Nachweis einer Leptospiren-bedingten rezidivierenden Uveitis bei Pferden**

#### **3.6.3.1. Nachweis von Antikörpern im Serum mittels MAR**

Der Zusammenhang zwischen agglutinierenden Serumantikörpern gegen Leptospiren und einer leptospirenbedingten Uveitis konnte nicht ausreichend belegt werden, da auch bei augengesunden Pferden häufig AK gegen Leptospiren nachgewiesen werden konnten und die Diagnose einer ERU somit inadäquat ist (Davidson et al., 1987, Matthews et al., 1987, Sillerud et al., 1987, Dwyer et al., 1995, Wollanke et al., 1998, Wollanke et al., 1998, Wollanke et al., 2000, Wollanke, 2002, Gesell, 2004, Wollanke et al., 2004, Gilger et al., 2008, Loibl, 2009, Malalana et al., 2017).

#### **3.6.3.2. Nachweis von Antikörpern in Kammerwasser- und Glaskörperproben**

Untersuchungen auf AK gegen Leptospiren und Leptospiren-Ag in Kammerwasser- und Glaskörperproben haben sich im Gegensatz zu den Serumuntersuchungen als nützlich in der Diagnosestellung der ERU erwiesen (Brem et al., 1998, Brem et al., 1999, Faber et al., 2000, Wollanke et al., 2000, Wollanke et al., 2001, Wollanke, 2002, Gesell, 2004, Hartskeerl et al., 2004, Wollanke et al., 2004, Brandes et al., 2007, Loibl, 2009, Baake et al., 2016).

Der Nachweis von AK gegen Leptospiren mittels MAR und ELISA ist in über 90 % der Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen möglich (Wollanke, 2002, Wollanke et al., 2004). Die Sensitivität und Spezifität beider Antikörpernachweise ist hier besonders hoch. Die MAR weist eine Sensitivität von 93 % und eine Spezifität von 100 % auf (Wollanke et al., 2000, Wollanke et al., 2001, Gesell, 2004, Loibl, 2009, Wollanke et al., 2018). Der ELISA weist im Vergleich mit der MAR sogar eine höhere Sensitivität (98 %) auf (Loibl, 2009).

Mit PCR-Untersuchungen konnten in über 70 % der untersuchten Glaskörperproben positive Ergebnisse erzielt werden (Wollanke, 2002, Wollanke et al., 2004) und obwohl auch der kulturelle Nachweis in vielen Fällen positiv ausfällt (Brem et al., 1998, Brem et al., 1999, Faber et al., 2000, Wollanke et al., 2000, Wollanke et al., 2001, Wollanke, 2002, Gesell, 2004, Hartskeerl et al., 2004), ist die PCR eindeutig die schnellere und zuverlässigere Variante.

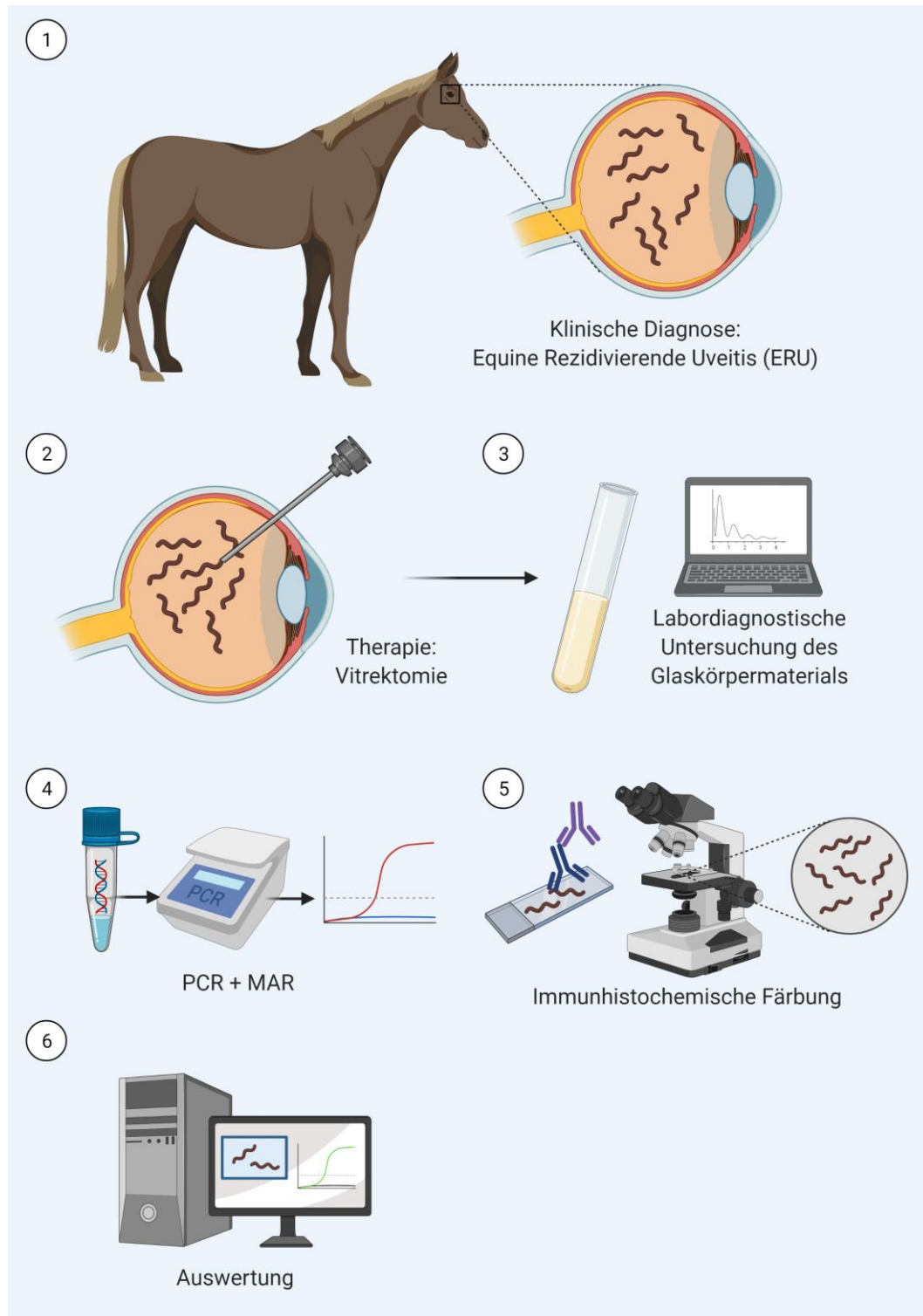
### **3.6.3.3. Nachweis von Antikörpern mittels „Snap-Lepto®“ -ELISA**

In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass ELISA-Untersuchungen im Gegensatz zu MAR-Untersuchungen beim Nachweis intraokularer AK gegen Leptospiren sensitiver waren. Insbesondere dem Nachweis von IgA-Antikörpern kommt hier eine besondere Bedeutung zu (Loibl, 2009, Loibl et al., 2018). Nun stellt der ELISA-Schnelltest (Snap-Lepto®) der Firma IDEXX eine kostengünstigere und schnellere Variante der Laboruntersuchungen dar. Dieser Schnelltest, welcher Spezies-unabhängig gegen das Oberflächenprotein LipL32 gerichtete Antikörper nachweist, ist jedoch nicht Serovar-spezifisch. In einer Studie ergab der Schnelltest bei 97 % der an ERU erkrankten Pferde ein positives Ergebnis bei Verwendung intraokularer Proben und wies im Vergleich mit der MAR ein sensitiveres Ergebnis auf (Wollanke et al., 2018, Geiger, 2019). Dadurch ist es in zweifelhaften Fällen einer leptospirenbedingten Uveitis oft möglich, innerhalb kürzester Zeit ein Ergebnis zu erhalten. Somit kann bei den betroffenen Pferden die Parazentese der vorderen Augenkammer und die bei positivem Ergebnis des Schnelltestes anschließende Vitrektomie innerhalb einer Narkose durchgeführt werden. Es muss im Falle eines positiven Schnelltestergebnisses nicht mehr auf den Probenversand und die Übermittlung des Laborergebnisses gewartet werden (Wollanke et al., 2018, Geiger, 2019).

Der Snap-Lepto® hat sogar bei Serumuntersuchungen eine relativ hohe Sensitivität (79 %) und Spezifität (95 %) ergeben und könnte als Screeningtest für eine leptospireninduzierte rezidivierende Uveitis bei Pferden herangezogen werden (Geiger, 2019).

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Übersicht



**Abb. III-1:** Grafische Darstellung der Vorgehensweise von der Untersuchung des Pferdes über die Probennahme bis zu den unterschiedlichen Untersuchungen der Probe und der Auswertung der Ergebnisse. (Erstellt mit BioRender.com)

## 2. Patientengut

Das Patientengut umfasst 149 Glaskörperproben von 139 Pferden, die im Zeitraum von Mai 2018 bis Oktober 2020 an der Klinik für Pferde der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München mit Verdacht auf eine ERU, bzw. mit der Diagnose ERU vorgestellt und daraufhin vitrektomiert wurden.

Von diesen 149 Glaskörperproben der 139 Pferde waren 79 Proben von 76 Pferden positiv in der quantitativen real-time PCR für den Nachweis des *lipL32*-Gens pathogener Leptospiren (s. Kap. IX.3.).

Diese 76 Pferde setzen sich aus 27 Stuten, 46 Wallachen und 3 Hengsten zusammen. Das Alter der erkrankten Patienten lag zwischen 2 und 24 Jahren und betrug im Durchschnitt 7,9 Jahre.

Unter den PCR-positiven Pferden waren 44 Warmblüter, 10 Isländer, jeweils 4 Friesen und PREs, 3 Trakehner, 2 Quarter Horses und jeweils 1 Pony, Appaloosa, Cruzado, Kaltblut, Lusitano, Paint Horse, Tinker, Traber und Vollblut.

Drei Glaskörperproben von Pferden mit klinisch gesunden Augen dienten als Negativkontrollen. Die Pferde wurden euthanasiert, was jedoch nicht in Verbindung mit der ERU oder einer anderen Augenerkrankung stand. Alle drei Proben waren negativ in der quantitativen real-time PCR für den Nachweis des *lipL32*-Gen pathogener Leptospiren (s. Kap. IX.3.).

Die drei augengesunden Pferde waren ein 8-jähriger und ein 17-jähriger Warmblut Wallach, sowie eine 23-jährige Haflinger Stute.

## 3. Diagnosestellung

Es folgte eine eingehende klinische sowie ophthalmologische Untersuchung die durch die Verfasserin an der Klinik für Pferde der LMU durchgeführt und dokumentiert wurde.

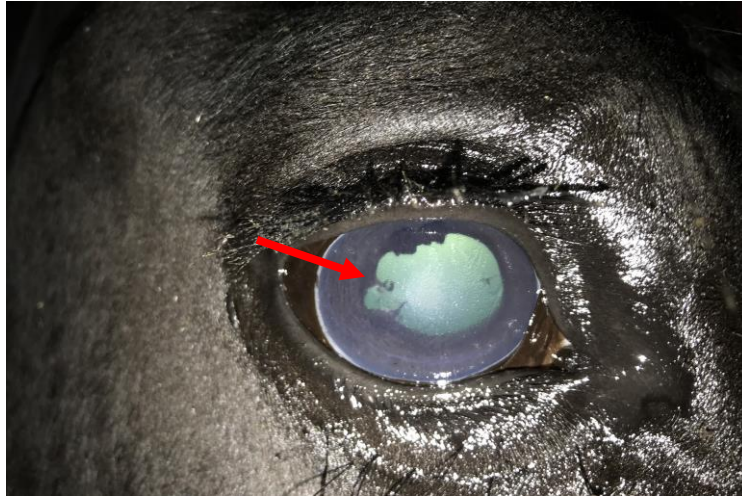
Nach gründlicher Anamneseerhebung, wobei besonderes Augenmerk auf den Zeitpunkt des Erscheinens der Augenerkrankung, die Anzahl der bereits abgelaufenen Entzündungsschübe und die zeitlichen Abstände der vergangenen Entzündungsschübe gelegt wurde, folgte bei allen

Patienten eine Augenuntersuchung des betroffenen Auges, die in einem verdunkelten, ruhigen Raum stattfand.

Begonnen wurde mit dem Drohreflex, um die Sehfähigkeit zu überprüfen, danach folgte seitenvergleichend die Adspektion der Augen und okularen Adnexe. Hierbei wurde auf Schwellung der Lider, Tränenspur oder eine bereits makroskopisch sichtbare Vergrößerung bzw. Verkleinerung des Augapfels geachtet. Danach wurden Konjunktiven, Kornea, vordere Augenkammer, Iris, und der Pupillarreflex unter Zuhilfenahme einer fokalen Lichtquelle („Hammerlampe“, Fa. Carl Zeiss) untersucht. Zudem wurden die Linse, Glaskörper, Netzhaut und Sehnerv mit einem Ophthalmoskop (Fa. Carl Zeiss) beurteilt. Hierfür wurde die Pupille, falls nicht zuvor schon ein Mydriatikum verabreicht worden war, mit entweder dem Mydriatikum Tropicamid („Mydriatikum Stulln“, Fa. Pharma Stulln) oder mit Atropin Augentropfen (Atropin-POS® 0,5 %, Fa. Ursapharm) weitgestellt, um möglichst weiträumig die hinteren Segmente des Auges einsehen zu können. Wenn aufgrund eines starken Pupillenkrampfes, vorderen oder hinteren Synechien, einer getrübbten Linse (mature Katarakt) oder eines hochgradig getrübbten Glaskörpers der Augenhintergrund nicht oder nur unzureichend beurteilt werden konnte, folgte eine ultrasonografische Untersuchung des Augapfels (Ultraschallgerät der Fa. GE Healthcare LOGIQ P6, Linearscanner, 12MHz).

Konnte die Diagnose „ERU“ anhand der Anamnese, den klinischen Symptomen oder den ophthalmoskopischen Befunden am Auge bestätigt werden, erfolgte nach medikamentöser Vorbehandlung (Atropin und Dexamethason enthaltende Augensalben sowie die Gabe eines nicht steroidalen Antiphlogistikums per os) über drei Tage die Pars-Plana-Vitrektomie unter allgemeiner Anästhesie. Die Vitrektomien wurden nach der von Gerhards und Wollanke (2005) beschriebenen Methode durchgeführt (Gerhards u. Wollanke, 2005).

Die folgenden Bilder zeigen Augen von Pferden, die nach der klinischen Untersuchung die Diagnose „ERU“ erhielten. In allen Glaskörperproben aus diesen an rezidivierender Uveitis erkrankten Augen waren Hinweise auf eine intraokulare Leptospireninfektion vorhanden. Es konnten entweder mittels MAR agglutinierende Antikörper gegen Leptospiren und/ oder mittels Snap-Lepto® gegen LipL32 gerichtete Antikörper und/ oder mittels Real-time PCR das *lipL32*-Gen direkt nachgewiesen werden.



**Abb. III-2:** Pferdeauge mit chronischer ERU; Entzündungsfreies Intervall einer chronisch rezidivierenden Uveitis bei einem 4-jährigen Friesenwallach mit typischen Befunden im Sinne der ERU: diffuse Hornhauttrübung, Pupille durch Gabe eines Mydriatikums ca. 2/3 weit, Dyskorie der Pupille durch multiple hintere Synechien (roter Pfeil), ventro-temporal rauchige Trübung im Bereich der Linsenvorderfläche, diffuse Glaskörpertrübung.

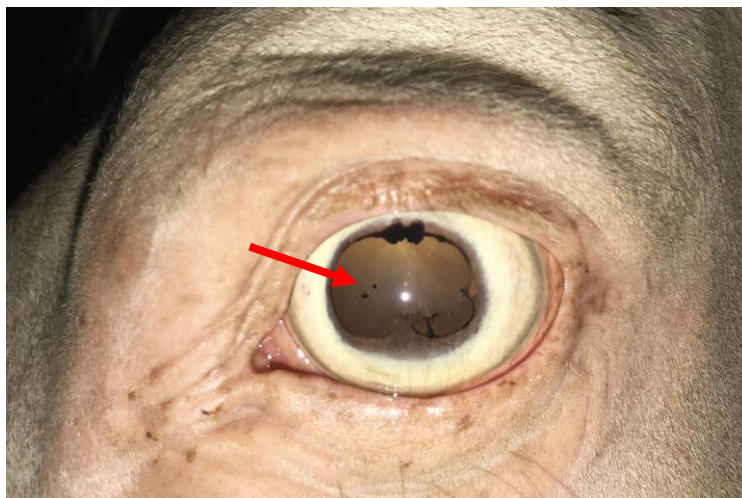


**Abb. III-3:** Pferdeauge mit akutem Schub einer ERU; abklingender klassischer akuter Uveitisschub im Verlauf einer ERU bei einem 10-jährigen Warmblutwallach: geringgradige diffuse Hornhauttrübung mit Neovaskularisation (ventral), vordere Augenkammer zu 2/3 mit frischem entzündlichem Exsudat gefüllt und ventral im Bereich der Blutgefäße zusätzlich älteres zusammengezogenes Gerinnsel, Pupille durch Gabe eines Mydriatikums ca. 2/3 weit, grün-gelblicher Fundusreflex aufgrund der hochgradigen diffusen Glaskörpertrübung.





**Abb. III-4:** Pferdeauge mit chronischer ERU; Entzündungsfreies Intervall einer chronisch rezidivierenden Uveitis bei einem 14-jährigen Englischen Vollblutwallach mit typischen Befunden im Sinne der ERU: geringgradige diffuse Hornhauttrübung, multiple hintere Synechien (rote Pfeile), dorsal und nasal des Blitzreflexes auf der Hornhaut sind entzündliche Einlagerungen im Glaskörper zu sehen.



**Abb. III-5:** Pferdeauge mit chronischer ERU; entzündungsfreies Intervall einer chronisch rezidivierenden Uveitis bei einem 6-jährigen Lusitanowallach mit Birkauge und typischen Befunden im Sinne der ERU: hintere Synechien (ventral und temporal), zwei Irisresiduen (nasal-zentral) (roter Pfeil) auf der Linsenvorderfläche, mittelgradige entzündlich bedingte Glaskörpereinlagerungen, Pupille durch Gabe eines Mydriatikums ca. 2/3 weit.



**Abb. III-6:** Pferdeauge mit ERU im Endstadium; entzündungsfreies Intervall einer chronisch rezidivierenden Uveitis bei einer 8-jährigen Hannoveraner Fuchsstute: ERU im Endstadium mit Bulbusatrophie, sehr flacher vorderer Augenkammer, großflächigen hinteren Synechien in Miosisstellung (Seclusio pupillae), fortgeschrittene Katarakt.



**Abb. III-7:** Vorderansicht eines Pferdes mit chronischer ERU; Die Stute aus Abb. III-6 von vorne: die hochgradige Atrophia bulbi des linken Auges ist bereits makroskopisch erkennbar.

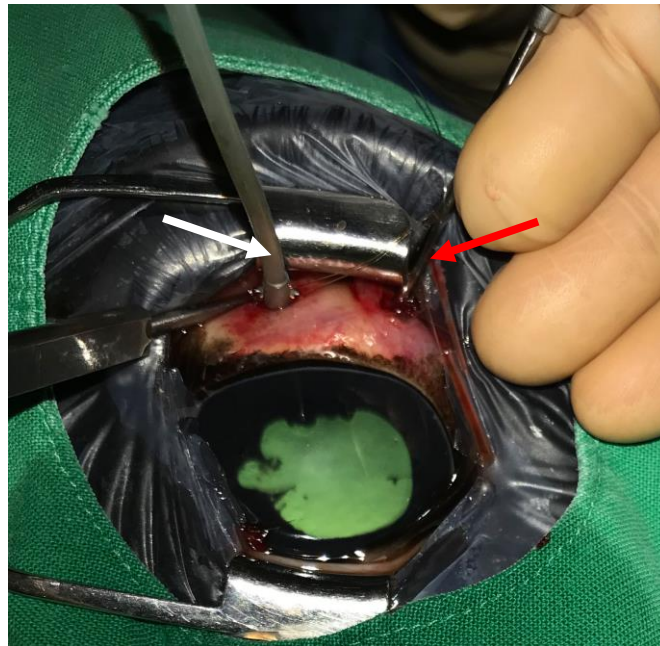
## **4. Probenmaterial**

### **4.1. Kulturleptospiren**

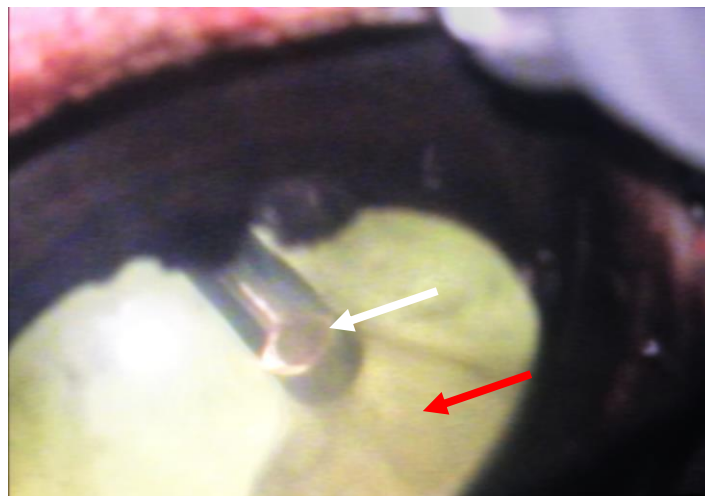
Die Kulturstämme der pathogenen Leptospiren (*L. interrogans*) wurden vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) Oberschleißheim zur Verfügung gestellt (DAkks-akkreditiertes Prüflaboratorium nach DIN EN ISO 17025, Reg.-Nr.: D-PL-19082-02-00). Die Bakterien waren vom LGL mit der MAR serotypisiert worden. Es wurden sechs verschiedene Serovare als Vergleichsgruppe verwendet (*L. Australis*, *L. Autumnalis*, *L. Bratislava*, *L. Grippotyphosa*, *L. Icterohaemorrhagiae*, *L. Pomona*). Die Leptospiren wurden noch vor Ort im LGL nach Ausstreichen auf Objektträger durch Hitze inaktiviert und danach für weitere Untersuchungen an dem Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München verbracht.

### **4.2. Glaskörperproben**

Im Zuge der bei an ERU erkrankten Augen therapeutisch indizierten Pars-Plana-Vitrektomie wurden zu Beginn der Operation ca. 3 ml unverdünntes Glaskörpermaterial steril über einen Dreiwegehahn gewonnen. Dafür wurde das Vitrektom 14 mm dorsal vom Limbus, im Bereich der Ora serrata, über die Sklera in den Glaskörperraum eingeführt.



**Abb. III-8:** Ausgangssituation für die Vitrektomie: Infusionsleitung (weißer Pfeil) und Vitrektom (roter Pfeil) befinden sich über einen Zugang in der Sklera im Glaskörperraum.



**Abb. III-9:** Probenentnahme im Zuge der Vitrektomie (Ansicht auf Monitor übertragenes Bild); Blick durch Pupillenöffnung in den Glaskörperraum. Das Vitrektom wurde über den dorsalen Zugang in der Sklera in den Glaskörperraum eingeführt. Am Ende des Operationsgerätes befindet sich die Öffnung (weißer Pfeil), die das Glaskörpermaterial und die darin enthaltenen Entzündungsprodukte ansaugt, zerschneidet und absaugt. Auf dem Bild sind deutlich erkennbare Glaskörpereinlagerungen zu sehen, die durch das Vitrektom angesaugt werden (roter Pfeil).

### **4.3. Negativkontrollen**

Drei Glaskörperproben von Pferden mit klinisch gesunden Augen dienten als Kontrollen. Nach der Euthanasie dieser Pferde, dessen Ursache nicht in Verbindung mit der ERU oder einer anderen Augenerkrankung stand, konnte das Glaskörpermaterial ebenfalls steril, über eine Kanüle (Einmal-Kanüle, SUPRA, Vivomed GmbH, Deutschland) entnommen werden.

## **5. Probenbearbeitung**

### **5.1. Labordiagnostische Untersuchungen**

Die unverdünnt gewonnene Glaskörperflüssigkeit aus an ERU erkrankten Augen wurde zur Untersuchung an ein Fremdlabor geschickt, um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um eine leptospirenbedingte Uveitis handelt (IVD GmbH Innovative Veterinärdiagnostik mbH, Seelze-Letter, Deutschland). Hierfür wurde zum Nachweis der Bakterien-DNA eine PCR, sowie zum Nachweis von Antikörper gegen Leptospiren die MAR mit 11 verschiedenen Serovaren der Serogruppen Australis, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Tarassovi und Sejroe durchgeführt. Bei der verwendeten PCR handelt es sich um eine quantitative real-time PCR zum Nachweis des *lipL32*-Gens, welches bei allen pathogenen Leptospiren vorhanden ist.

Die Glaskörperproben der Negativkontrollen wurden für die gleichen labordiagnostischen Untersuchungen an das oben genannte Fremdlabor geschickt. Die MAR und PCR fielen hier negativ aus.

### **5.2. Herstellung der Ausstriche für die histologischen Färbungen**

Für die Herstellung der Ausstriche aus den Glaskörperproben stand nach Abzug eines Teiles der Probe für die labordiagnostischen Untersuchungen nur noch knapp 1 ml unverdünntes Glaskörpermaterial zur Verfügung. Dieses geringe Volumen entspricht nur einem Bruchteil des Glaskörpers beim Pferd, der physiologischerweise ein Volumen von ca. 28 ml aufweist. Die Glaskörperprobe wies zudem eine inhomogene Konsistenz auf (wässrige Anteile sowie zum Teil schleimige oder sehr visköse Anteile), was das Ausstreichen problematisch gestaltete und



zu unregelmäßigen Ausstrichen führte. Von jeder Glaskörperprobe konnten ca. 10 Ausstriche angefertigt werden.

Für die histologischen Färbungen wurden sowohl die Kulturstämme direkt nach Erhalt aus der Kultivierung und das Glaskörpermaterial direkt im Anschluss der Probengewinnung auf Objektträger (OT) (Thermo Scientific, Superfrost Ultra Plus®, Menzel, Deutschland) ausgestrichen, luftgetrocknet und zur Hitzefixierung 3x durch die Bunsenbrennerflamme gezogen. Die Hitzefixierung der Kulturstämme erfolgte im Labor des LGL (s. Kap. 4.1.).

### **5.2.1. Silberimprägnierung**

Für die Silberimprägnierung wurde das modifizierte Protokoll nach Warthin-Starry verwendet (Riedelsheimer u. Büchl-Zimmermann, 2015). Alle verwendeten Lösungen wurden mit saurem Aqua dest. pH 3,7 - 4,0 angesetzt (s. Kap. IX.1.). Die Lösungen wurden vor Beginn auf 60 °C erhitzt. Die einzelnen Schritte sind im folgenden Protokoll stichpunktartig aufgeführt.

#### Protokoll der Warthin-Starry-Silberimprägnierung:

1. OT 3 x für jeweils 10 Sek. in Aqua dest. schwenken
2. OT in 1%iger Silbernitratlösung (Fa. Morphisto, Frankfurt am Main, Deutschland) für 30 Min. bei 60 °C im Dunkeln inkubieren
3. OT für 10 Sek. bei 60 °C in Aqua dest. schwenken

Entwickler-Lösung (Ansatz für 5 OT):

- 7 ml 5 %ige Gelatine (Difco Laboratories Inc., USA)
- 4 ml Silberverstärker Stammlösung B (Fa. Morphisto, Frankfurt am Main, Deutschland)
- 3 ml 2 % Silbernitratlösung

Alle Komponenten der Entwickler-Lösung wurden separat abgemessen und erst kurz vor Verwendung zusammengegeben.

4. Entwickler-Lösung für ca. 2 - 3 Min. bei 60 °C auf die OT geben und unter Sichtkontrolle entwickeln lassen
5. OT 2 x für jeweils 1 Min. bei 60 °C mit Aqua dest. spülen
6. 5 % Natriumthiosulfat (Fa. Morphisto, Frankfurt am Main, Deutschland) für 2 Min. bei Raumtemperatur inkubieren
7. 3 Min. unter fließendem Wasser spülen
8. Nochmal ca. 20 Min. wässern

Die Positivkontrollen waren die vom LGL bereitgestellten Kulturstämme der pathogenen Leptospiren sowie Gewebeschnitte vom Kleinhirn einer Wachtel. Die Negativkontrollen waren folgende:

- Ausstriche von Glaskörperproben augengesunder Pferde
- Ausstriche von an ERU erkrankten Pferden, die PCR-negativ waren

Bei keiner der Negativkontrollen konnten Hinweise auf Leptospiren oder Formen der Biofilmbildung gefunden werden.

### **5.2.2. Immunhistochemische Färbung**

Der verwendete Primärantikörper für die immunhistochemische Färbung (Anti-Leptospira rabbit antiserum) wurde vom Academic Medical Center (amc) aus Amsterdam, Niederlande bereitgestellt (s. Kap. IX.2.). Er richtet sich spezifisch gegen Lipopolysaccharide der Oberfläche pathogener Leptospiren. Der verwendete Sekundärantikörper (Biotinylated Anti-rabbit IgG) ist von der Firma Biozol in Eching, Deutschland. Die Antigen-Antikörper-Reaktion wurde durch DAB-Lösung (Detektorsystem) (Fa. Leica) sichtbar gemacht. Es kam lediglich eine Charge der verwendeten Antikörper zum Einsatz.

Für die Immunhistochemische Färbung wurden alle Inkubationsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Waschschrte wurden in Phosphate Buffered Saline (PBS)-Puffer (pH 7,4) durchgeführt. Die einzelnen Schritte sind im folgenden Protokoll stichpunktartig aufgelistet.

Protokoll der immunhistochemischen Färbung:

1. Ausstriche 1 x für 4 Min. in PBS-Puffer waschen
2. Blocken unspezifischer Bindungen für Antikörper mit Dako Protein-Block-Serum-Free (Dako GmbH, Jena, Deutschland) 5 Min. inkubieren, danach nur abgießen
3. Primärantikörper (Anti Leptospira rabbit antiserum, Academic Medical Center, Amsterdam, Niederlande) Verdünnung: 1:5120 in Dako Antibody Diluent (Dako GmbH, Jena, Deutschland) für eine Stunde inkubieren
4. 2 x für jeweils 1 Min. in PBS-Puffer waschen
5. Sekundärantikörper (Biotinylated Anti-Rabbit IgG, Biozol, Eching, Deutschland), Verdünnung 1:300, für 30 Min. inkubieren
6. 2 x für jeweils 1 Min. in PBS-Puffer waschen
7. Markierung des Sekundärantikörpers mit Streptavidin Horseradish-Peroxidase (Streptavidin-HRP, Leica, Deutschland) für 20 Min.
8. 2 x für jeweils 1 Min. waschen
9. Entwicklung der Reaktion in DAB-Lösung (Dako GmbH, Jena, Deutschland) für 5 Min.
10. 1 x in PBS-Puffer und anschließend 1 x in Leitungswasser waschen
11. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (1 x Ethanol 70 %, 1 x Ethanol 96 %, 2 x Isopropanol), OT jeweils kurz spülen
12. Entfernen des Alkohols mit Xylol
13. Eindecken der Ausstriche mit Eukitt® (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
14. Lufttrocknen

Die Positivkontrollen waren die vom LGL bereitgestellten Kulturstämme der pathogenen Leptospiren. Die Negativkontrollen waren folgende:

- Ausstriche von Kulturleptospiren, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden
- Ausstriche von Glaskörperproben augengesunder Pferde
- Ausstriche von an ERU erkrankten Pferden, die PCR-negativ waren

Bei keiner der Negativkontrollen konnten Hinweise auf Leptospiren oder Formen der Biofilmbildung gefunden werden.



### **5.3. Auswertung**

Die mikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation der Warthin-Starry Färbung sowie der immunhistochemischen Färbung erfolgte mit einem Mikroskop der Firma Leica (Leica DM 5000B), welches mit einer Kamera gekoppelt war (Leica DFC 3000G, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar). Es wurden Objektive mit 40-facher und 100-facher Vergrößerung verwendet. Jeder Objektträger wurde standardmäßig zunächst mit dem 40x Objektiv und anschließend mit dem 100x Objektiv mit Öl mäanderförmig untersucht. Bereiche mit positivem Befund wurden markiert, dokumentiert und schließlich fotografiert. Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse im weiteren Verlauf der Untersuchungen in Gruppen unterteilt (s. Kap. IV.2.). Im Ergebnisteil werden representative Abbildungen verwendet.

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Morphologische Darstellung der Kulturleptospiren

#### 1.1. Silberimprägnierung

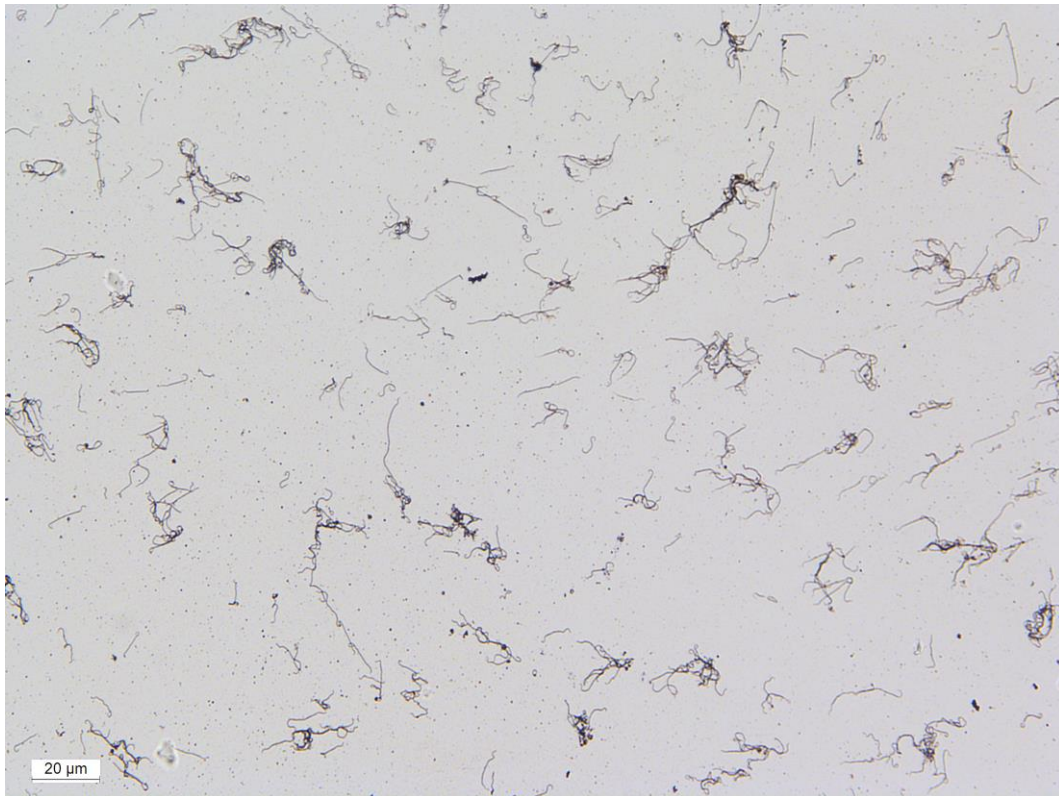
Die Versilberung nach Warthin-Starry stellt eine Übersichtsfärbung für die Darstellung von Leptospiren dar. Da weder Leptospiren noch andere Spirochaeten durch die üblichen histologischen Standardfärbungen sichtbar gemacht werden können, ist die Silberimprägnierung nach Warthin-Starry der Goldstandard zum Nachweis von Spirochaeten. Die folgenden Abbildungen zeigen verschiedene Serovare pathogener Kulturleptospiren (*L. interrogans*), die mit dieser Technik sichtbar gemacht wurden.

Die Kulturleptospiren sind zwischen ca. 6 µm und 25 µm lang. Bei allen Serovaren kann man sowohl einzeln liegende Bakterien als auch Paarungen von zwei oder mehreren zusammenliegenden Bakterien erkennen. Diese liegen dann entweder sich überkreuzend, aber auch längs oder hintereinander zusammen. Bei Akkumulationen von mehreren Leptospiren gibt es zum Teil Ansammlungen, bei denen die einzelnen Mikroorganismen noch klar voneinander abgrenzbar sind, aber auch Haufen von Bakterien, in denen sie so dicht aneinander und umeinander verschlungen liegen, dass die einzelnen Leptospiren nicht mehr eindeutig voneinander zu trennen sind und die genaue Anzahl nicht bestimmt werden kann. Vor allem bei den einzeln liegenden Leptospiren sind die typischen hakenförmigen Enden an einem oder auch an beiden Enden zu erkennen.

Die einzeln liegenden Bakterien stellen sich teilweise S-förmig, U-förmig oder L-förmig dar oder haben lediglich einen leicht gebogenen Verlauf. Andere wiederum sind komplett langgestreckt, wobei dann auch das hakenförmige Ende nicht mehr zu erkennen ist.

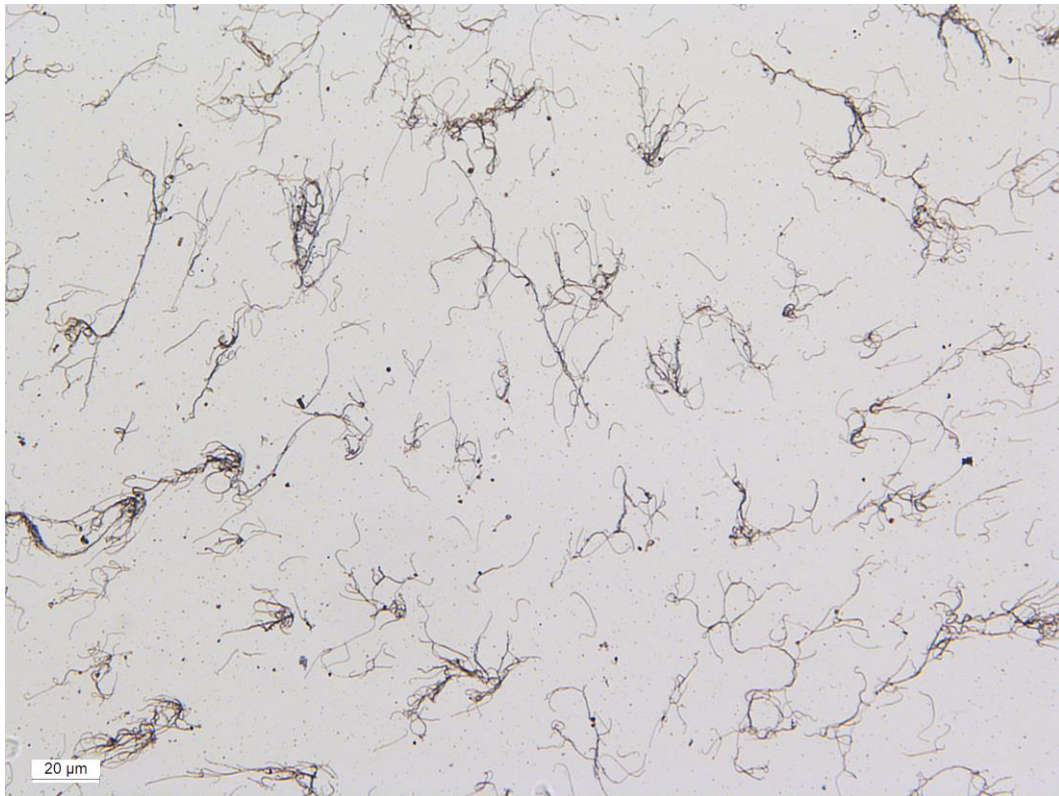
Wenn zwei einzelne Bakterien hintereinander liegen erscheinen sie teilweise wie eine einzelne sehr lange Leptospire. Bei genauerer Betrachtung kann man jedoch eine kleine Lücke oder ein hakenförmiges Ende zwischen den beiden Mikroorganismen erkennen.

Die „Haufen“ ohne erkennbare einzelne Leptospiren sind teilweise sehr dicht gepackt und erscheinen als Knäuel. An den Rändern sind die Enden von einzelnen Leptospiren zu erkennen.



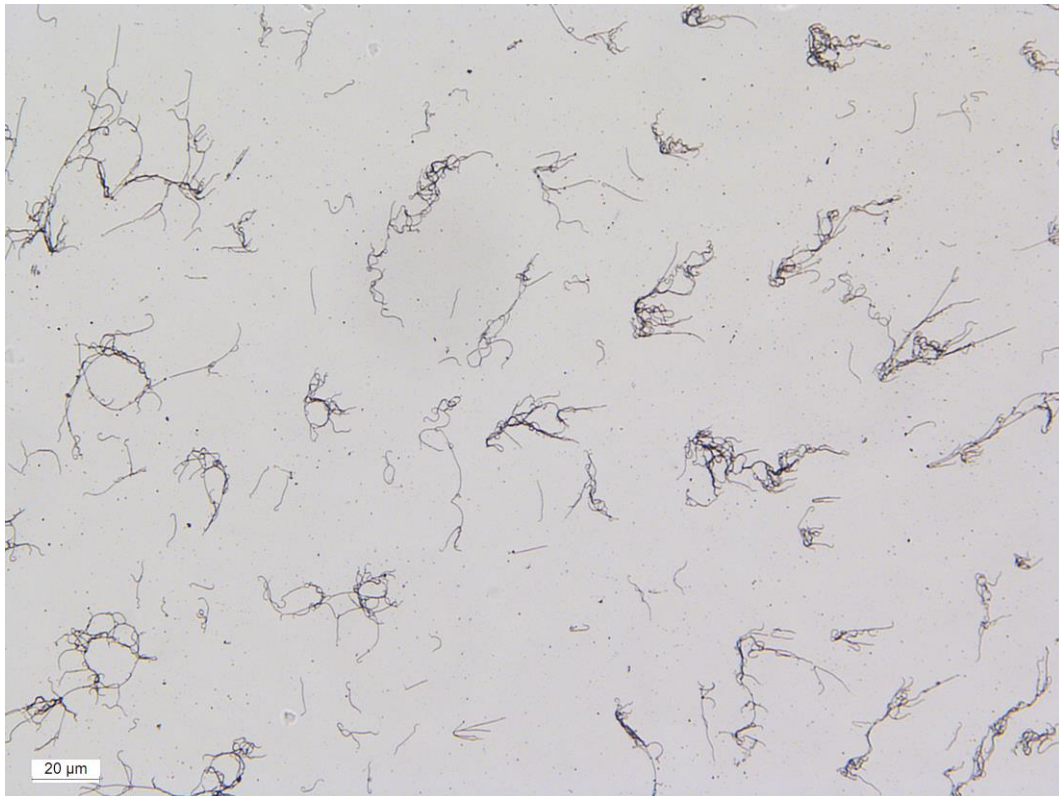
**Abb. IV-1:** Kulturleptospiren: *L. interrogans* Serovar Australis; Warthin-Starry-Färbung

**L. Australis:** Das Verteilungsmuster bei dieser Serovar ist willkürlich, es ist keine gerichtete Anordnung zu erkennen und die Bakteriendichte ist sehr regelmäßig. Das Längenverhältnis ist ebenfalls sehr gleichmäßig verteilt, es sind gleichviele kürzere, mittellange und lange Leptospiren zu erkennen. Die einzelnen Bakterien stellen sich als sehr dünne fädige Strukturen dar. Es sind eher weniger dicht gepackte Haufen zu sehen.



**Abb. IV-2:** Kulturleptospiren: *L. interrogans* Serovar Autumnalis; Warthin-Starry-Färbung

**L. Autumnalis:** Bei dieser Serovar stellen sich die Leptospiren ebenfalls als feine fädige Strukturen dar. Die Bakteriendichte ist geringfügig höher als bei der Serovar Australis. Hier überwiegen die längeren Leptospiren (20 µm -25 µm). Einzelne Leptospiren sind etwas seltener vorhanden. Die Akkumulation zu dichten Bakterienhaufen, bei denen die einzelnen Mikroorganismen nicht zu mehr eindeutig auseinanderzuhalten sind, ist hier deutlich häufiger. Das Verteilungsmuster ist auch hier sehr willkürlich.



**Abb. IV-3:** Kulturleptospiren: *L. interrogans* Serovar Bratislava; Warthin-Starry-Färbung

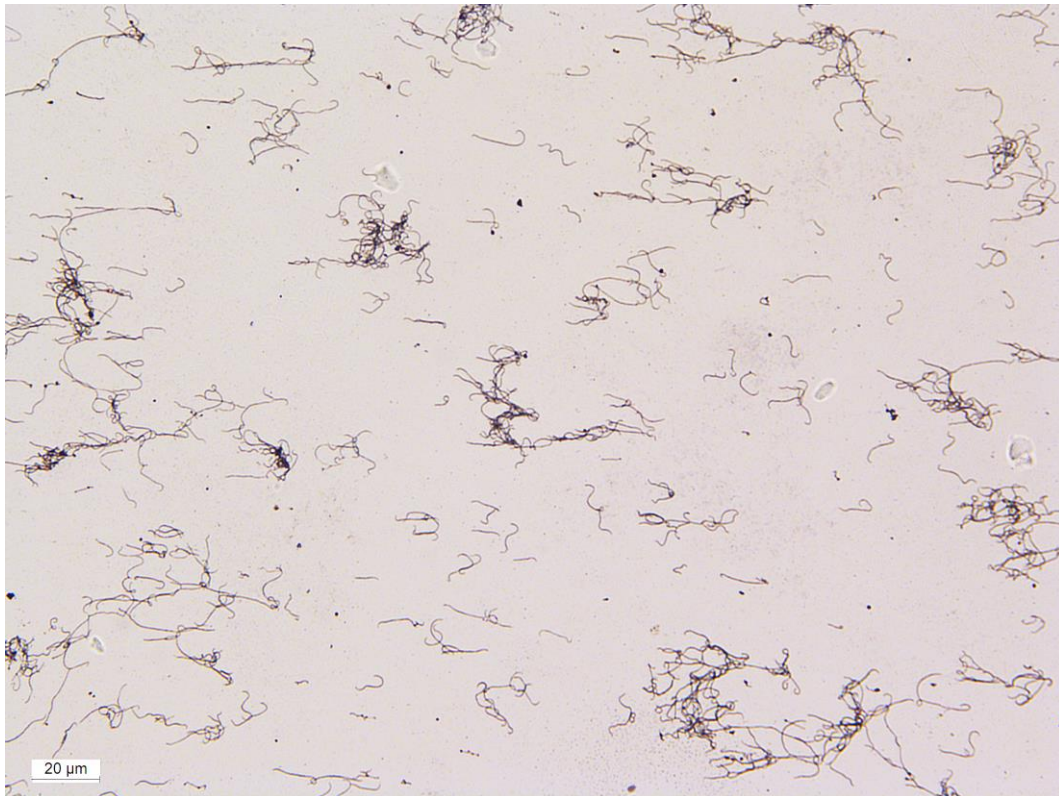
**L. Bratislava:** Hier besteht ein sehr ausgewogenes Bild hinsichtlich einzeln liegender und zusammengelagerter Leptospiren. Auffallend ist das seltenere Auftreten von großen dichten Zellhaufen. Manche Leptospiren liegen so gekrümmt aneinander, dass sie sich irgendwann wieder treffen und so eine kreisförmige Struktur bilden. Die Bakteriendichte ist vergleichbar mit der der Serovar Australis. Auch hier gibt es keine deutliche Ausrichtung der Leptospiren, die Anordnung ist willkürlich.





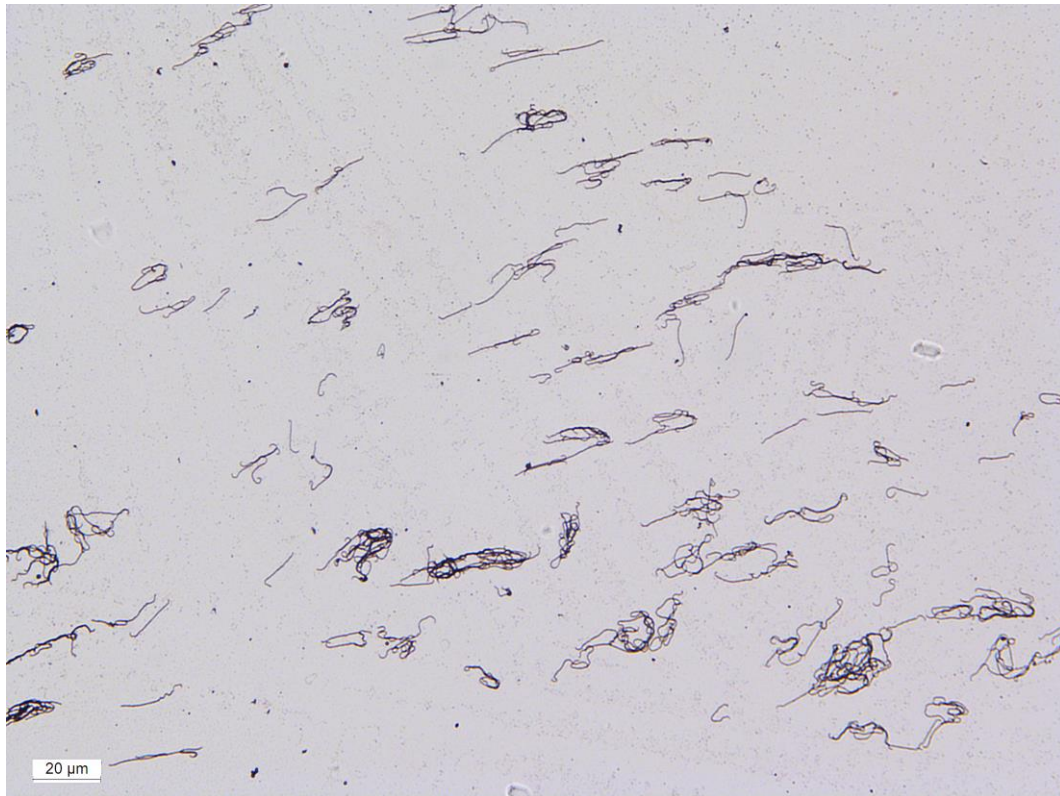
**Abb. IV-4:** Kulturleptospiren: *L. interrogans* Seroovar Grippotyphosa; Warthin-Starry-Färbung

**L. Grippotyphosa:** Bei dieser Seroovar überwiegen deutlich die einzeln liegenden Mikroorganismen. Auch hier sind S-förmige Bakterien zu erkennen, der Großteil liegt jedoch gestreckt in der Mitte mit mehr oder weniger starken Krümmungen und zu Haken eingerollten Enden vor. Sie wirken etwas gedrungener als die anderen gezeigten Vertreter und erscheinen somit geringgradig dicker. Es überwiegen deutlich die kürzeren Leptospiren zwischen 6 µm und 15 µm. Es sind vereinzelt sich überkreuzende oder aneinander liegende Bakterien zu beobachten, wobei die Leptospiren immer deutlich voneinander abgrenzbar sind. Die Haufenbildung fehlt bei dieser Seroovar komplett.



**Abb. IV-5:** Kulturleptospiren: *L. interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae; Warthin-Starry-Färbung

***L. Icterohaemorrhagiae*:** Hier ist die Verteilung ähnlich regelmäßig wie bei der Serovar Autumnalis. Es sind jeweils durchschnittlich gleich viele einzeln liegende Bakterien, sowie Akkumulationen als auch dichte Zellhaufen zu erkennen. Die Anordnung ist willkürlich wie bei den anderen Serovaren.



**Abb. IV-6:** Kulturleptospiren: *L. interrogans* Serovar Pomona; Warthin-Starry-Färbung

**L. Pomona:** Liegen die Bakterien als einzelne Organismen vor, so sind sie fast ausschließlich in lang gestreckter Form zu sehen. Nur vereinzelt sind kleinere Krümmungen zu erkennen. Aber auch hier sind die Bakterienhaufen vieler Leptospiren vorhanden, ohne dass bei dieser Ansammlung einzelne Leptospiren zählbar sind.



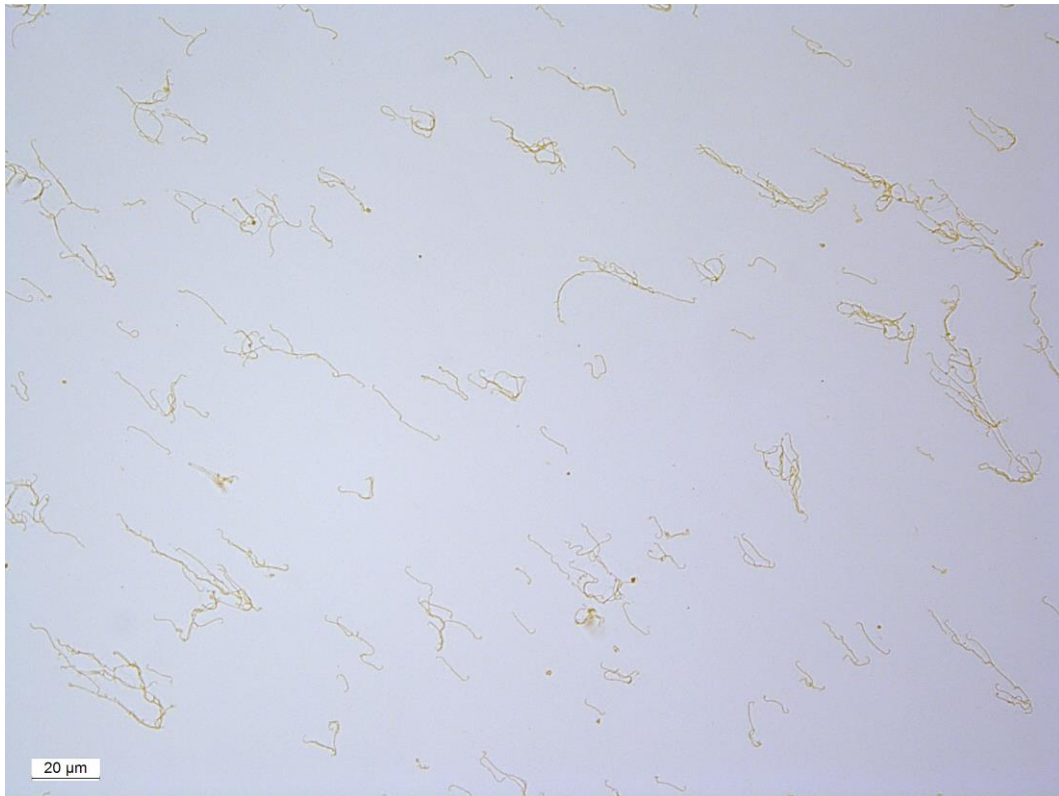
## 1.2. Immunhistochemische Färbung

Durch die spezifische Bindung des Antikörpers an Lipopolysaccharide auf der Oberfläche pathogener Leptospiren, können hier die verschiedenen Serovare der pathogenen Kulturleptospiren sichtbar gemacht werden.

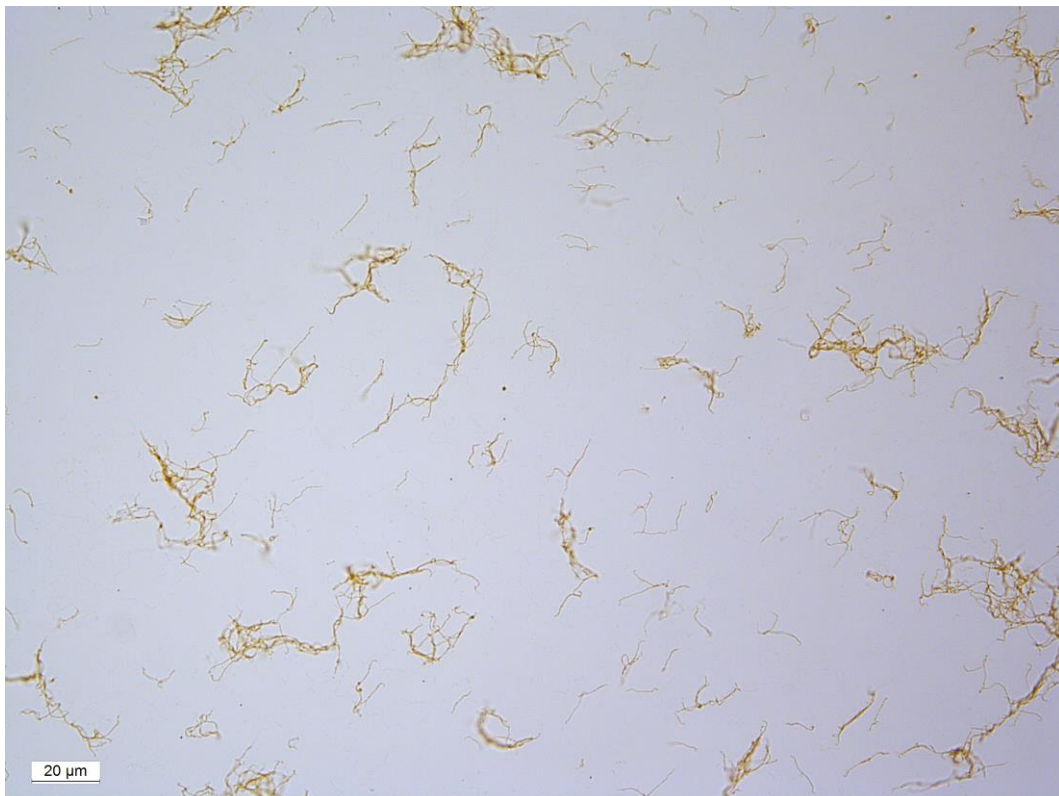
Die verschiedenen Serovare zeigen in der Versilberung und in der Immunhistochemie (IHC) die gleiche Morphologie (s. Kap. IV.1.1.).



**Abb. IV-7:** Kulturleptospiren: *L. interrogans* Serovar Australis; IHC



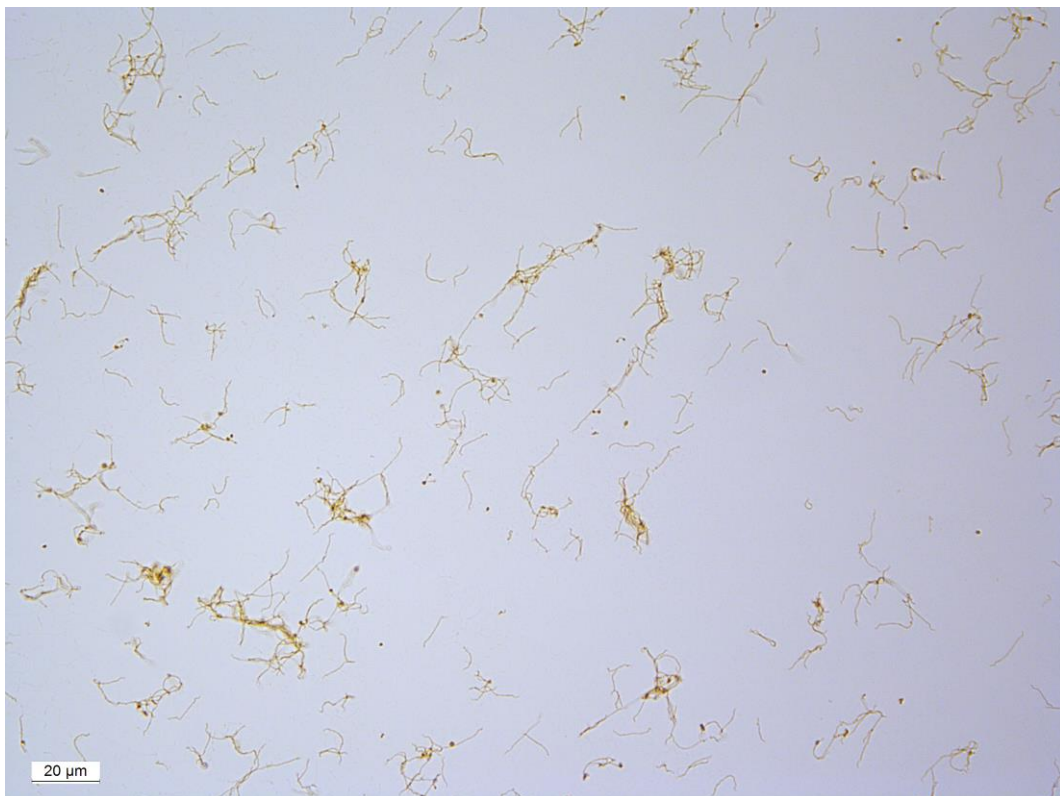
**Abb. IV-8:** Kulturleptospiren: *L. interrogans* Serovar Autumnalis; IHC



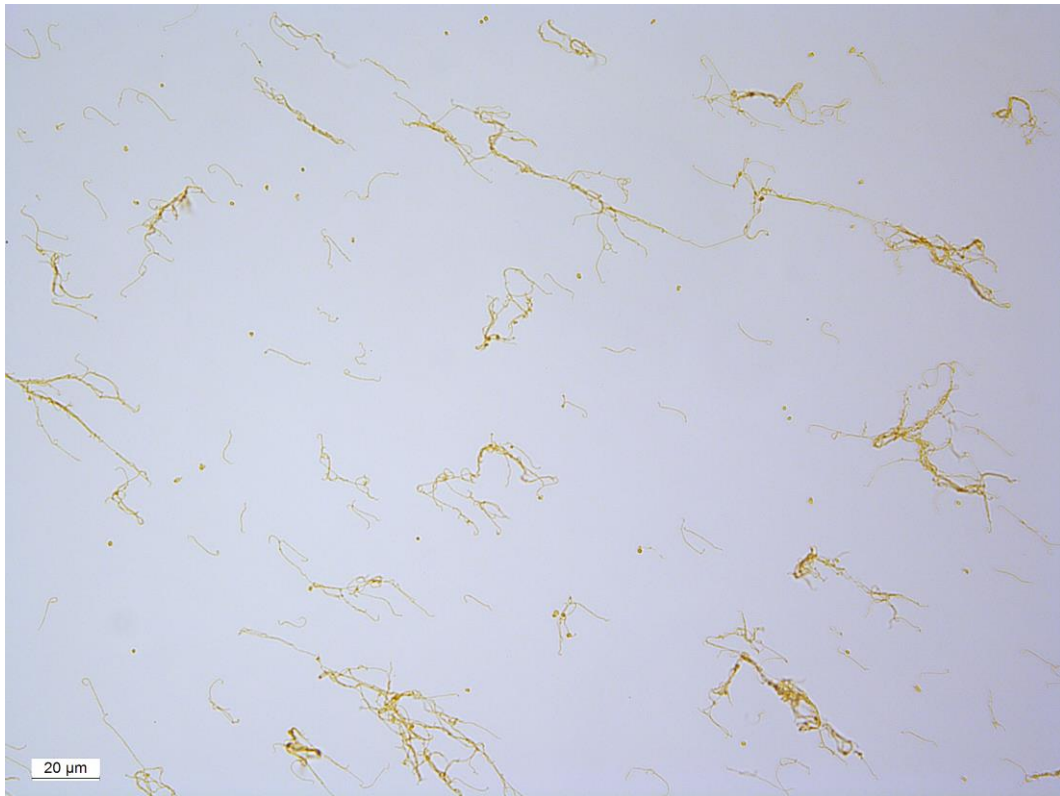
**Abb. IV-9:** Kulturleptospiren: *L. interrogans* Serovar Bratislava; IHC



**Abb. IV-10:** Kulturleptospiren: *L. interrogans* Serovar Grippotyposa; IHC



**Abb. IV-11:** Kulturleptospiren: *L. interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae; IHC



**Abb. IV-12:** Kulturleptospiren: *L. interrogans* Serovar Pomona; IHC

## **2. Morphologische Darstellung von Leptospiren in Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen**

Die Bildung von Biofilm läuft generell nach einem definierten Schema ab (Jamal et al., 2018) (s. Kap.II.1.2.):

- 1) Initialer Kontakt der Bakterien und Anhaftung an eine Oberfläche
- 2) Entstehung von Mikrokolonien
- 3) Synthetisierung der Biofilm-Matrix
- 4) Freisetzung von Bakterien/ Streuung von Teilen des Biofilms

Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse der histologischen Färbungen der Glaskörperproben anhand dieses Schemas in drei Gruppen unterteilt:

- Gruppe I: Abbildungen von einzelnen Leptospiren (Schritt 1 oder 4 der Biofilmbildung)
- Gruppe II: Abbildungen von Leptospiren, die sich zu unterschiedlich großen Zellclustern, bzw. sog. Mikrokolonien zusammenfinden (Schritt 2 der Biofilmbildung).
- Gruppe III: Abbildungen, bei denen ein ausgereifter Biofilm, bzw. eine Biofilm-ähnliche Struktur deutlich zu erkennen ist. Leptospiren sind dann meist anhand ihrer Morphologie am Rand der kugeligen Biofilm-ähnlichen Strukturen zu erkennen (Schritt 3 der Biofilmbildung).

Die folgenden Abbildungen sind repräsentativ für die jeweils gefundenen Strukturen der verwendeten Glaskörperproben dieser Studie. Von den gewonnenen Glaskörperproben wurde nach den erfolgten labordiagnostischen Untersuchungen eine Stichprobe für die histologischen Färbungen verwendet (s. Kap. IX.3.). Durch die geringe Probenmenge im Vergleich zum gesamten Glaskörpervolumen, sowie die inhomogene Beschaffenheit der Glaskörperprobe, liefern die Ergebnisse lediglich einen kleinen Einblick in die Vorgänge im gesamten Glaskörper.

Auf manchen Abbildungen sind die Strukturen von zwei oder allen drei Gruppen gleichzeitig zu sehen. Die Zuordnung zu den Gruppen I bis III erfolgte dann jeweils anhand des überwiegenden Bildes der Leptospirenkonformation.

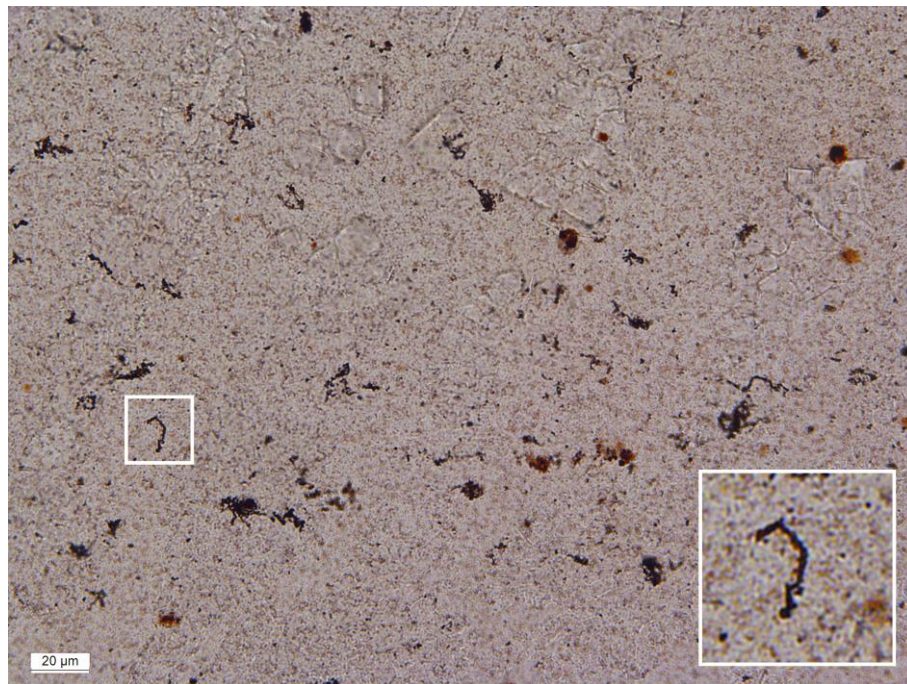
## **2.1. Silberimprägnierung**

### Übersicht:

Auf den Übersichtsaufnahmen (s. Abb. 13, 14 u. 15) der silberimprägnierten Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen zeigen sich deutlich dunkel gefärbte Leptospiren. Auch die für diese Bakterien typischen hakenförmigen Enden sind bereits in dieser Vergrößerung zu erkennen, werden aber in folgenden Abbildungen noch einmal vergrößert dargestellt. Ebenso sind Ansammlungen von mehreren Leptospiren in Form von „Mikrokolonien“ zu erkennen, die sich als dichtere schwarze „Haufen“ darstellen. Komplette verdichtete Material (schwarze, rundliche Strukturen) könnten Hinweise auf eine Biofilm-ähnliche Struktur darstellen, da randständig einzeln liegende Leptospirenanteile aus dem dicht gepackten Material herausragen. Durch die Silberimprägnierung wird Hintergrundmaterial ebenfalls angefärbt und stellt sich hell bis dunkelbraun dar, die schwarz gefärbten Bakterien sind jedoch eindeutig davon zu differenzieren.

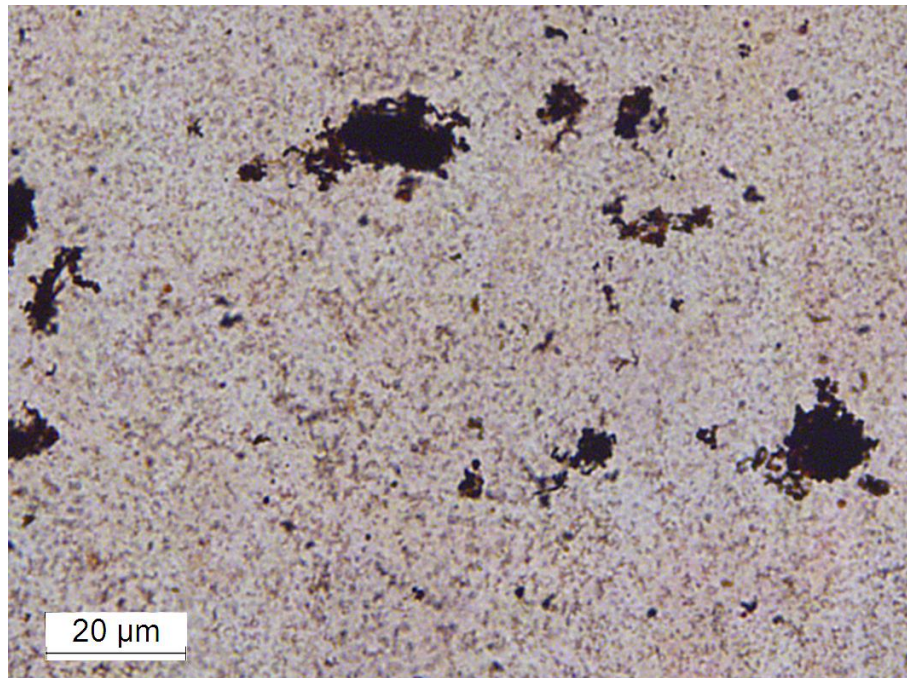
Alle Abbildungen in Kap. IV.2.1. sind von derselben Glaskörperprobe. Das klinische Bild zeigte eine hochgradige diffuse Glaskörpertrübung mit wolkigen Einlagerungen. Die Serovar mit dem höchsten Titer in der MAR war Pomona (1:3200) und es lag ein positives PCR Ergebnis vor.





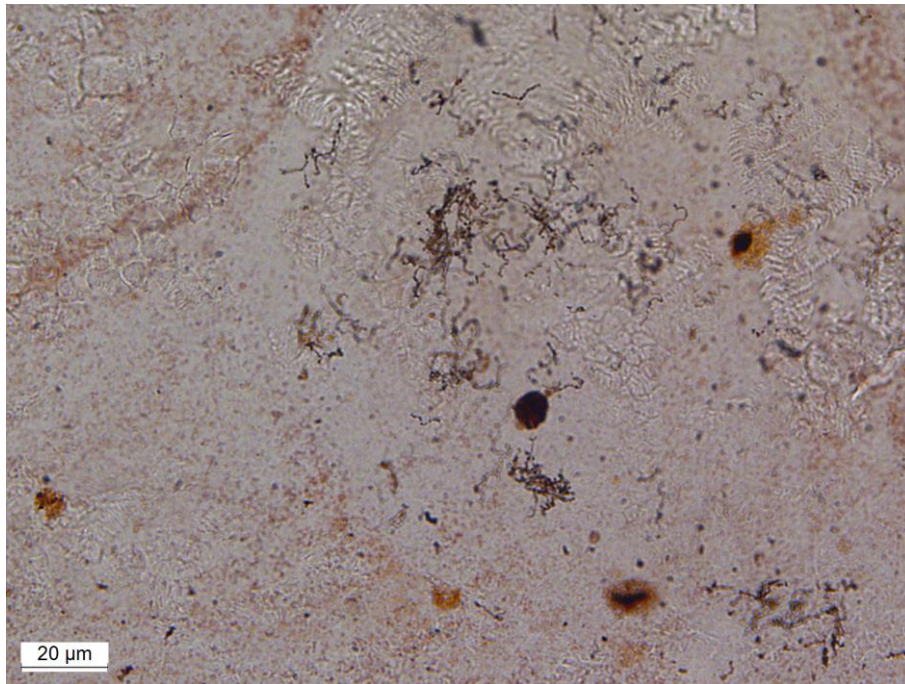
**Abb. IV-13:** Übersichtsaufnahme: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge.

In der Detailansicht ist eine einzelne Leptospire zu erkennen, hier sind die schraubenförmigen Windungen des Bakterienkörpers zu sehen.



**Abb. IV-14:** Übersichtsaufnahme: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge.

Die Abbildung zeigt zwei prominente rundliche Strukturen. Am Rand dieser Strukturen schauen Teile von Leptospiren heraus.



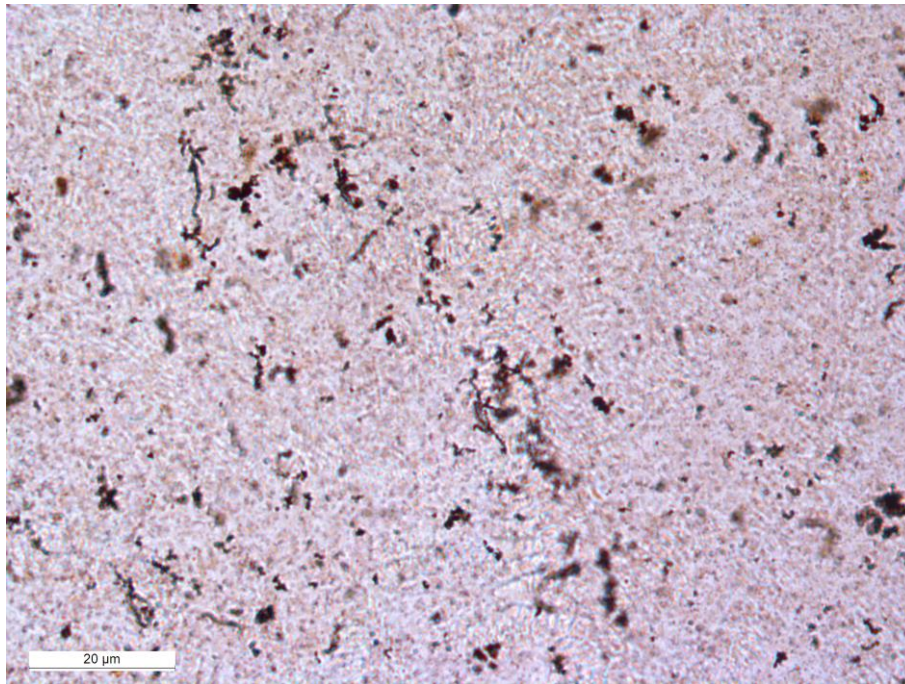
**Abb. IV-15:** Übersichtsaufnahme: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

Zentral in dieser Abbildung zeigt sich eine kugelförmige Struktur, bei „2 Uhr“ schaut eine Leptospire aus dieser Struktur heraus. Weiter zeigen sich mehrere einzeln liegende Leptospiren, aber auch Ansammlungen von mehreren Leptospiren.

Gruppe I (einzelne Leptospiren):

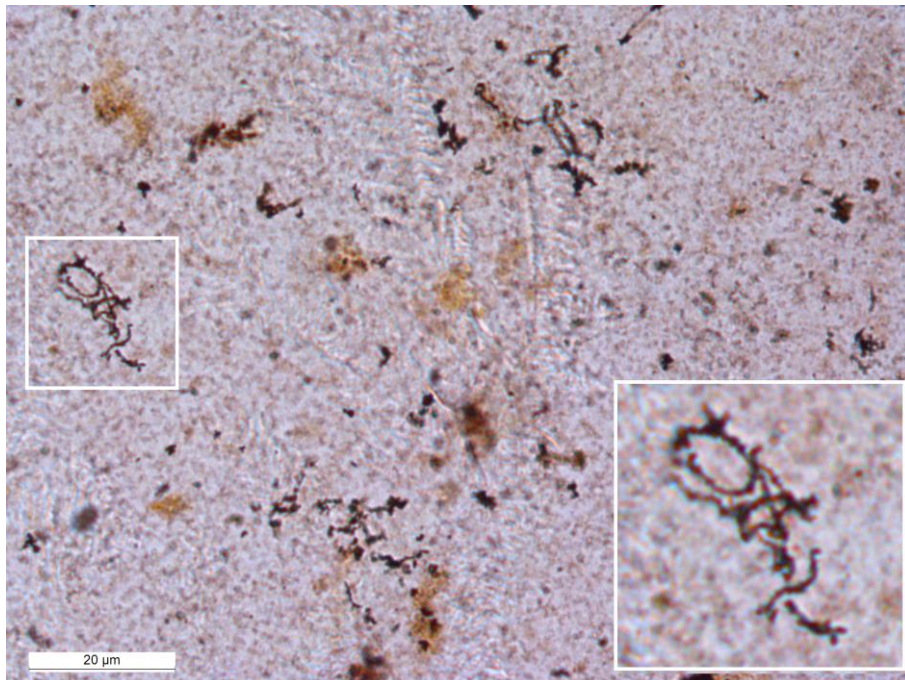
Auf den Abbildungen in dieser Gruppe sind einzelne Leptospiren durch die Versilberung nach Warthin-Starry dargestellt. Die Leptospiren zeigen eine Länge von 5 µm bis zu ca. 20 µm. Die für Leptospiren typischen hakenförmigen Enden sind sowohl an einem als auch an beiden Enden der Einzelorganismen deutlich zu sehen. Teilweise liegen zwei oder mehrere Leptospiren aneinander oder kreuzen sich, wobei die Einzelorganismen dabei gut voneinander abzugrenzen sind. In dieser Färbung ist die unterschiedliche Dicke einzelner Leptospiren eindeutig zu sehen (s. Abb. 16 - 20).





**Abb. IV-16:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

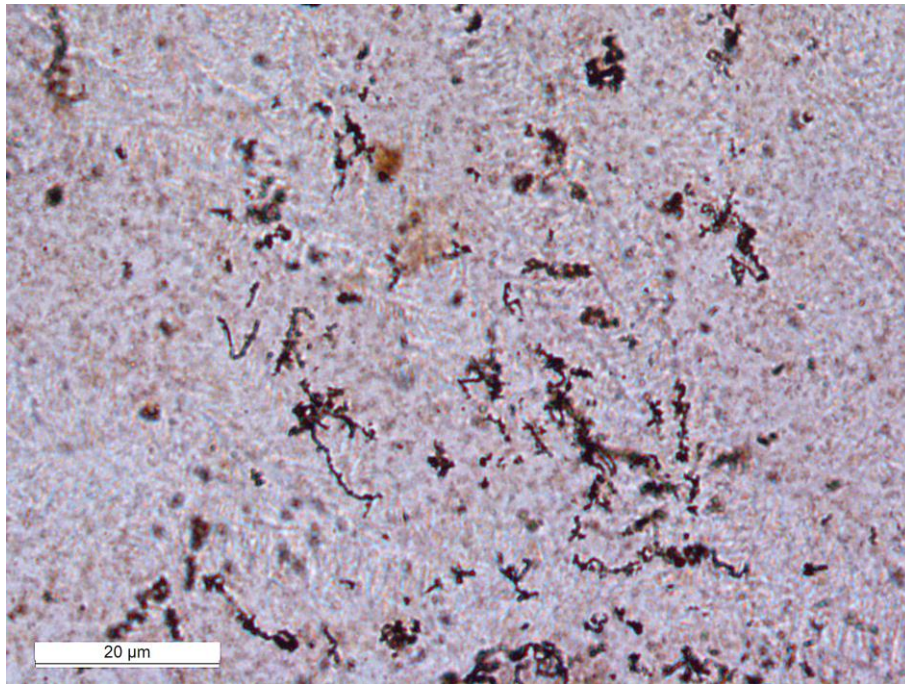
Auf der Abbildung sind überwiegend einzeln liegende Leptospiren zu sehen, die teilweise sehr dick erscheinen.



**Abb. IV-17:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

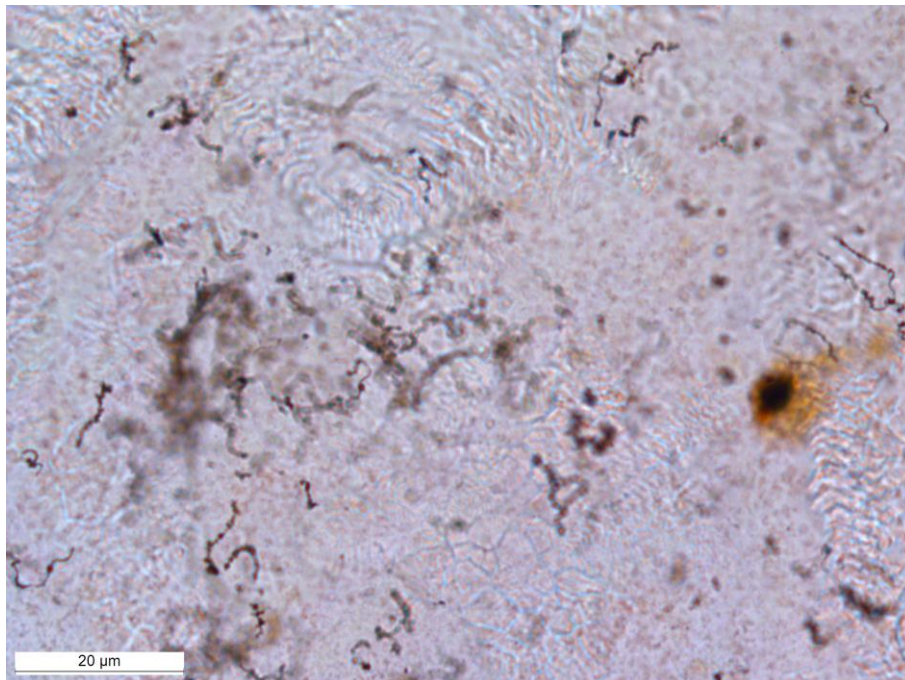
Detailansicht von mehreren, lose zusammengelagerten Leptospiren. Die typischen hakenförmigen Enden sind deutlich zu erkennen.





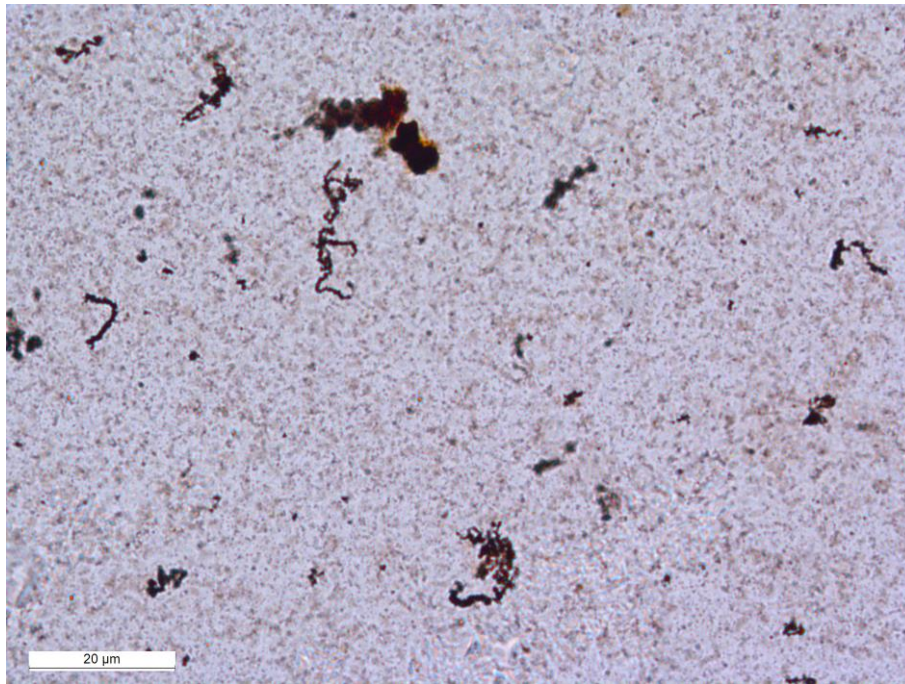
**Abb. IV-18:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

Die Abbildung zeigt überwiegend einzeln liegende Leptospiren, die teilweise sehr dick erscheinen.



**Abb. IV-19:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

Es sind mehrere einzelne Leptospiren zu sehen die sich gleichmäßig verteilen.

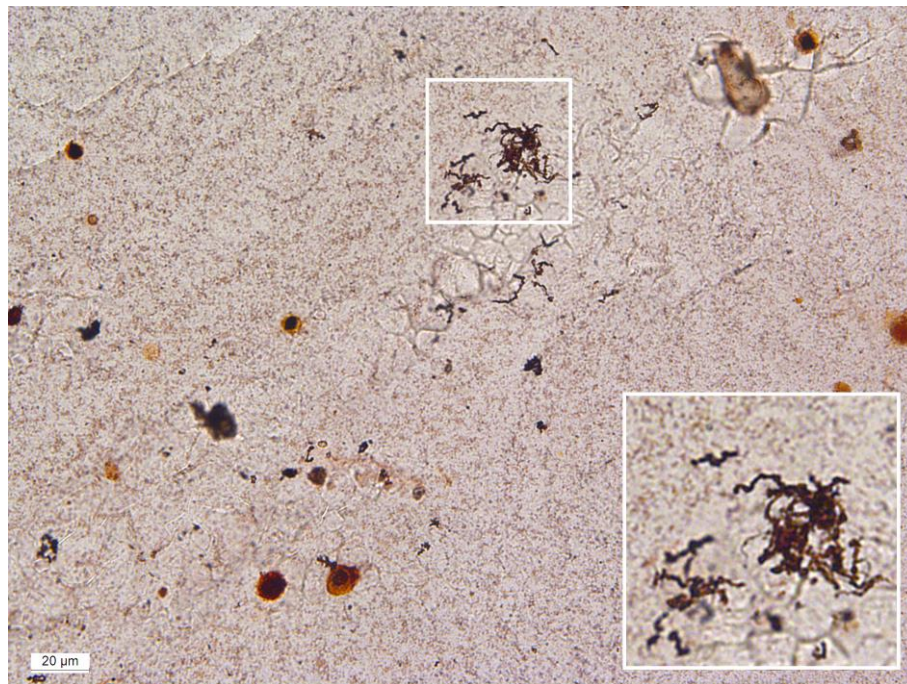


**Abb. IV-20:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge  
Die Abbildung zeigt einzelne, sehr dicke Leptospiren.

Gruppe II (Leptospiren-Kluster bzw. Mikrokolonien):

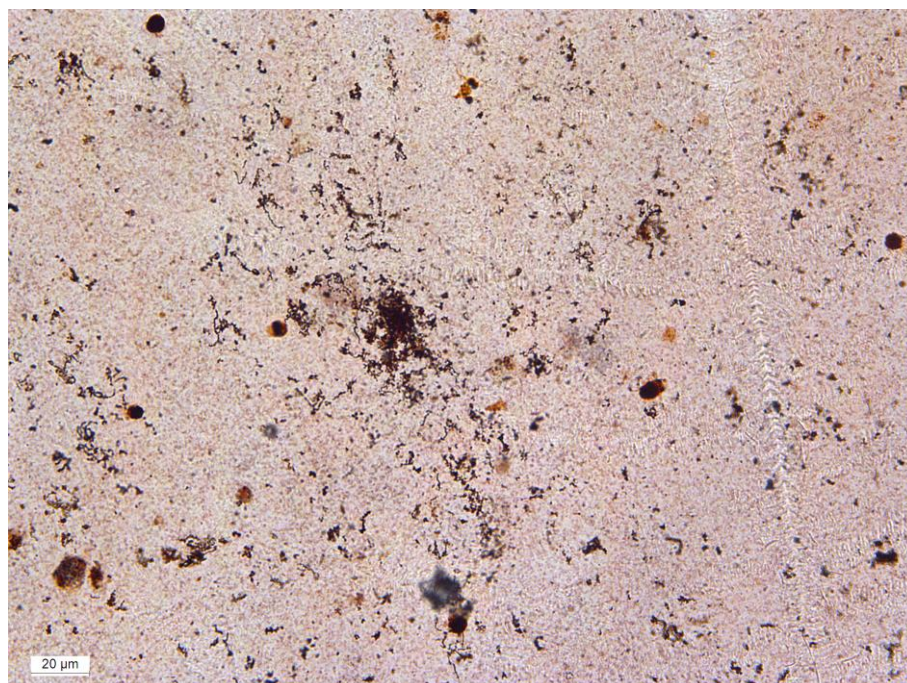
Auf den Abbildungen zu dieser Gruppe sind Leptospiren abgebildet, die sich durch Formation zu kleinen Mikrokolonien zusammengelagert haben. Es sind aber auch weiterhin einzeln liegende Bakterien in unmittelbarer Nähe dieser Mikrokolonien zu sehen, die Gruppe I zugeordnet werden können. Die Bakterien in den Mikrokolonien bilden annähernd runde, teilweise auch ovale Strukturen. Innerhalb dieser Struktur liegen die Leptospiren dicht aneinander und übereinander, so dass nur an wenigen Stellen der Hintergrund (hellbraun) zu erkennen ist. Die Kolonien sind inhomogen gefärbt, teilweise sind schwarze oder dunkelbraune „griesähnliche“ Körnungen zu sehen. Strukturen der Leptospiren sind hier nur noch am Rand zu erkennen (s. Abb. 21 - 31).





**Abb. IV-21:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

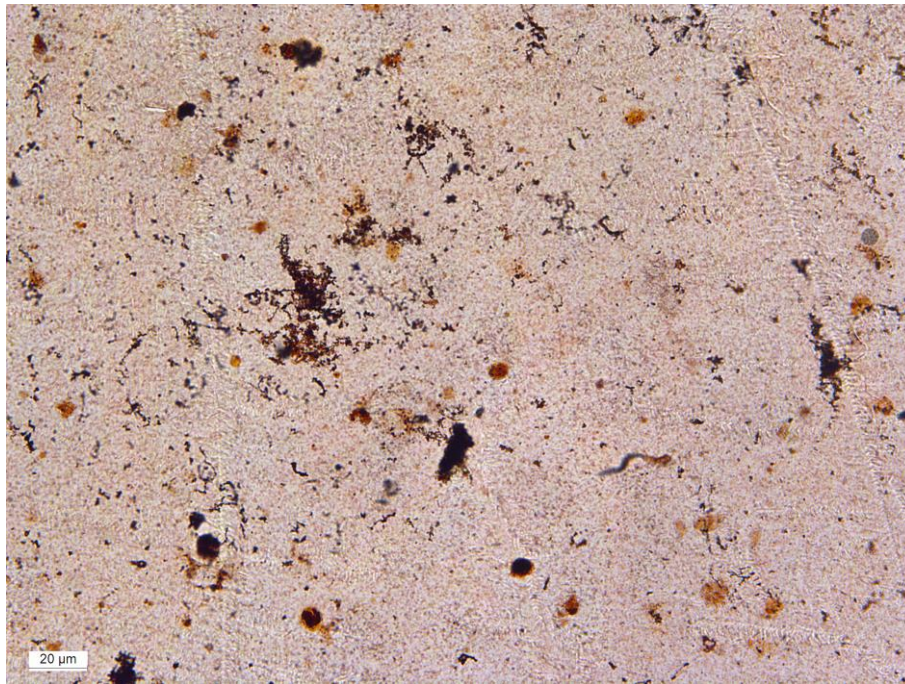
Ansammlung von mehreren Leptospiren. In der Detailansicht ist die lockere Konformation dieser Ansammlung zu sehen, wobei die einzelnen Leptospiren noch gut voneinander zu trennen sind.



**Abb. IV-22:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

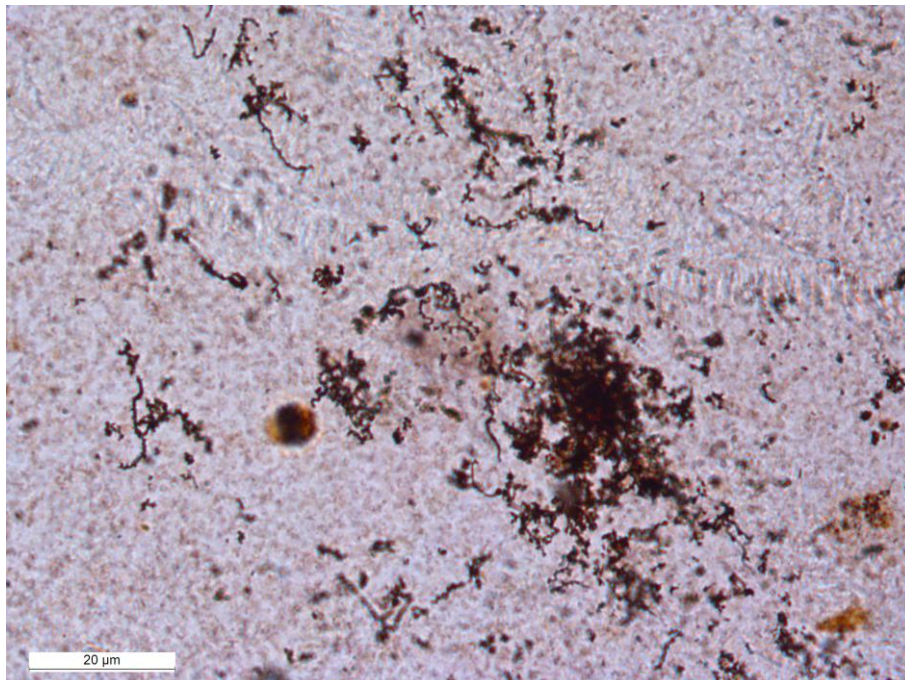
Zentral liegt ein kompaktes Konstrukt aus mehreren Leptospiren. In der Peripherie liegen vermehrt einzelne Leptospiren.





**Abb. IV-23:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

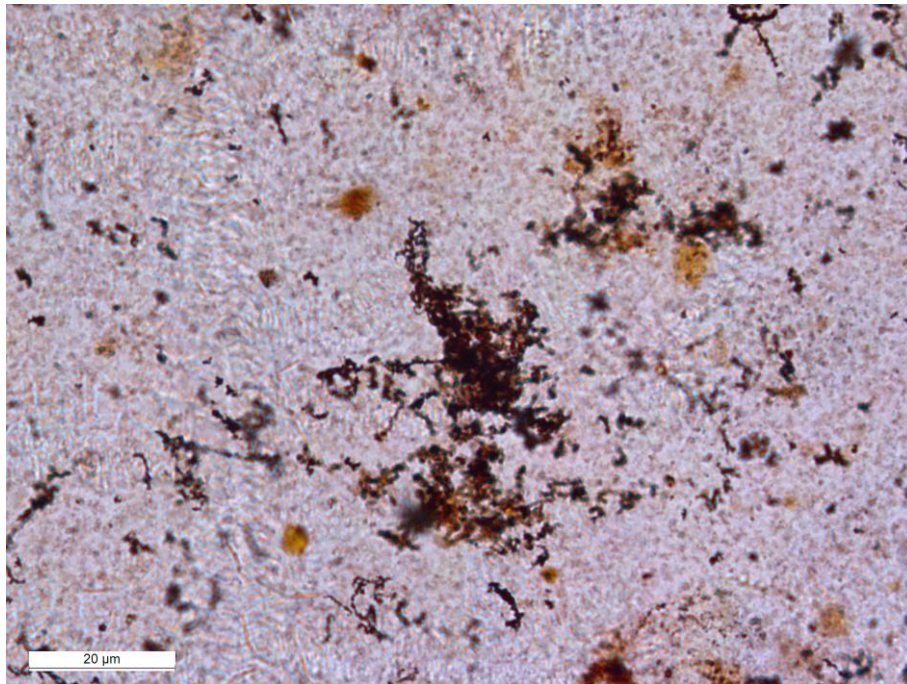
Die Abbildung zeigt mehrere einzelne Leptospiren, die sich an manchen Stellen zu „Haufen“ zusammenlagern.



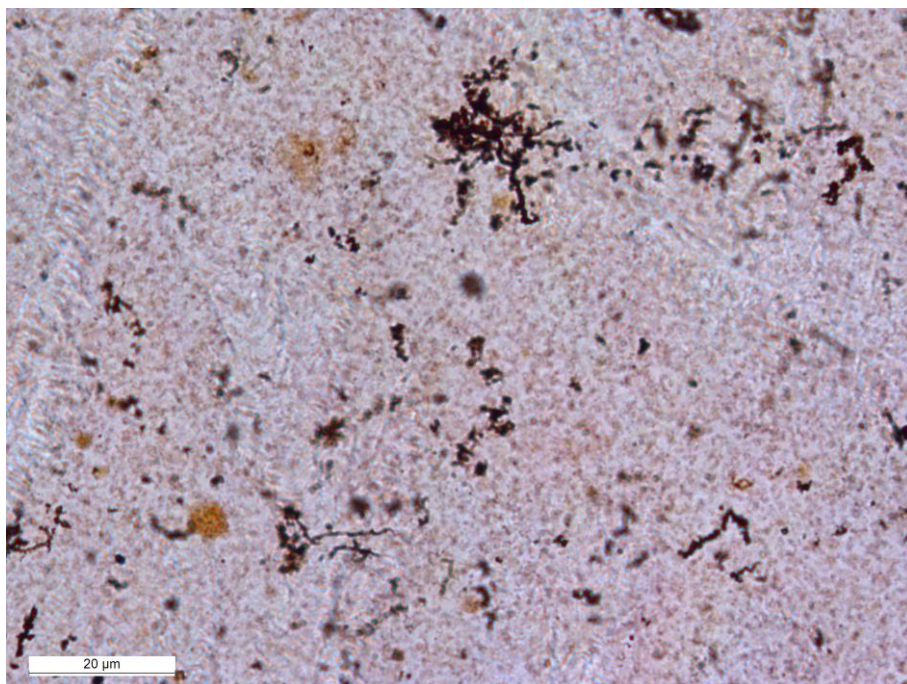
**Abb. IV-24:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

Vergrößerte Ansicht eines Leptospiren-Konstruktes. Am Rand sind die einzelnen Leptospiren sehr deutlich erkennbar. Zusätzlich viele einzeln liegende Leptospiren.



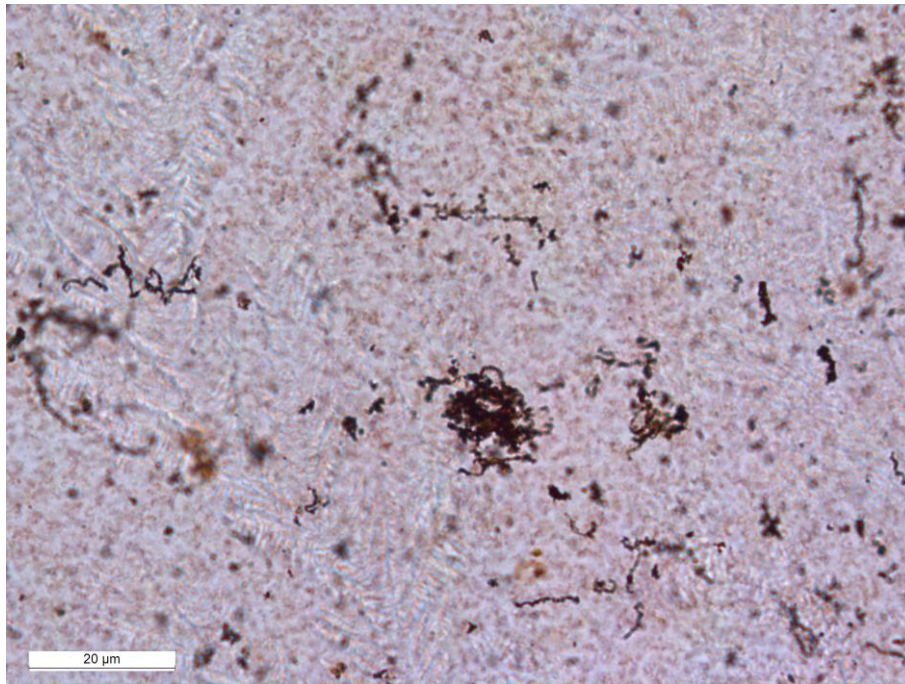


**Abb. IV-25:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge  
Zentral liegender „Haufen“, aus dem einzelne Leptospiren am Rand herausragen.



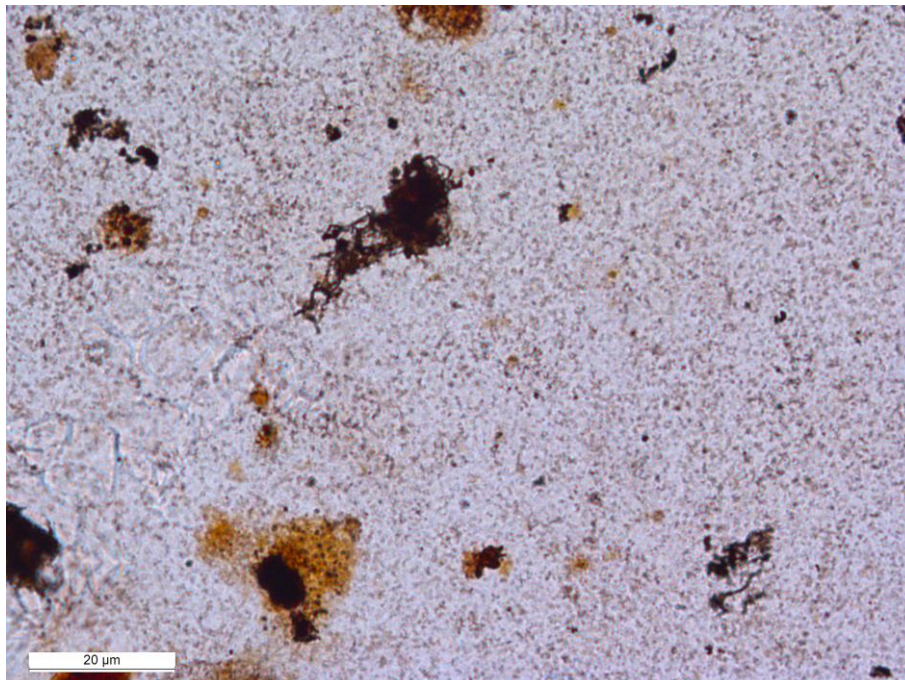
**Abb. IV-26:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge  
Am oberen Bildrand ist eine kleine und sehr lockere Leptospiren-Ansammlung zu erkennen.





**Abb. IV-27:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

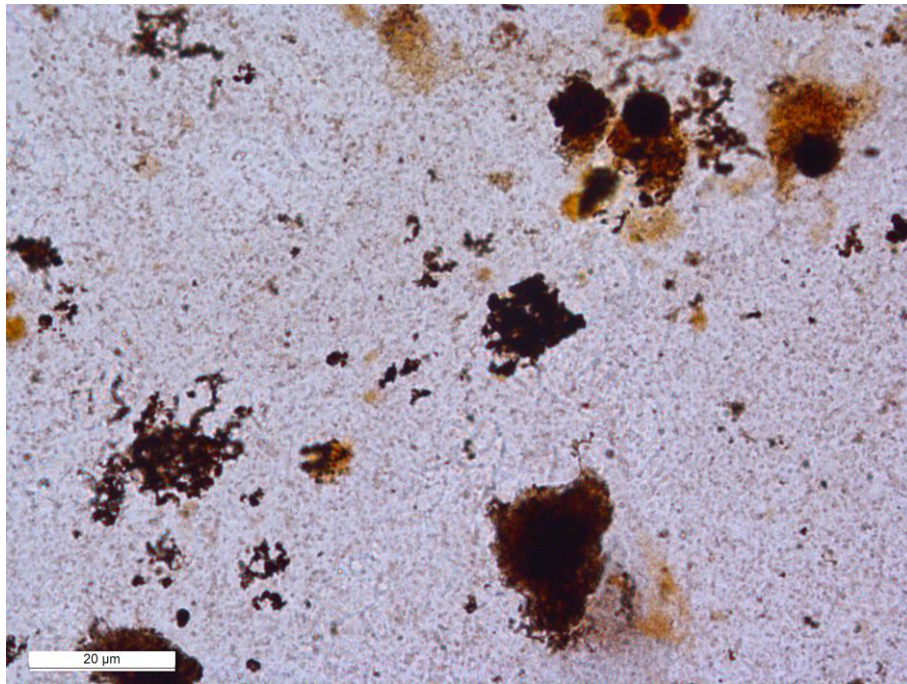
Im Zentrum dieser Abbildung zeigt sich eine rundliche und bereits relativ dichte Ansammlung von Leptospiren. In der Peripherie liegen überwiegend einzelne Leptospiren.



**Abb. IV-28:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

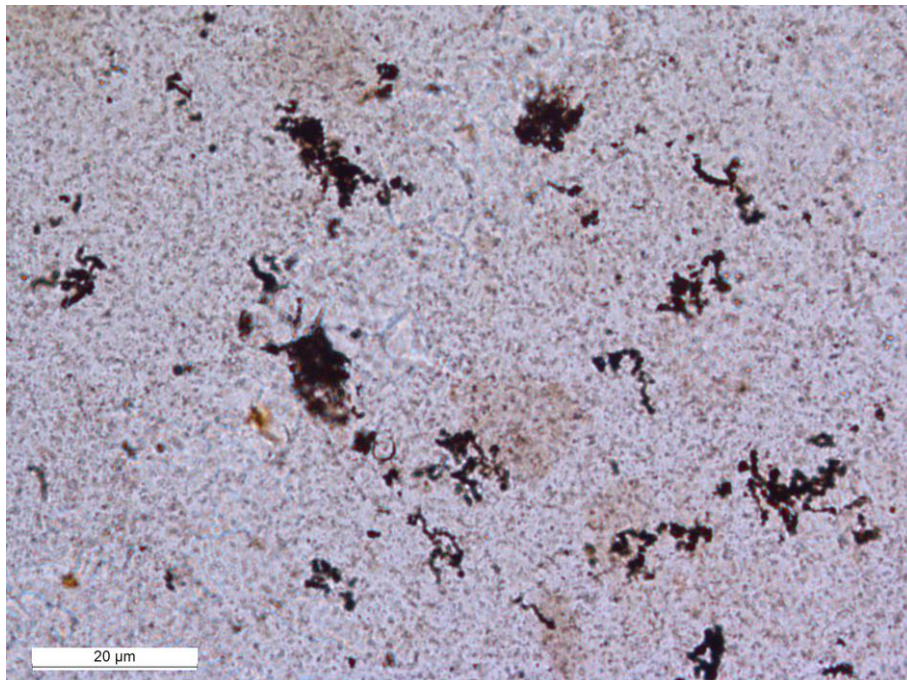
Die zentral liegende Struktur zeigt eine rundliche dichte Struktur, wobei am unteren linken Rand einzelne Leptospiren-Anteile erkennbar sind.





**Abb. IV-29:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

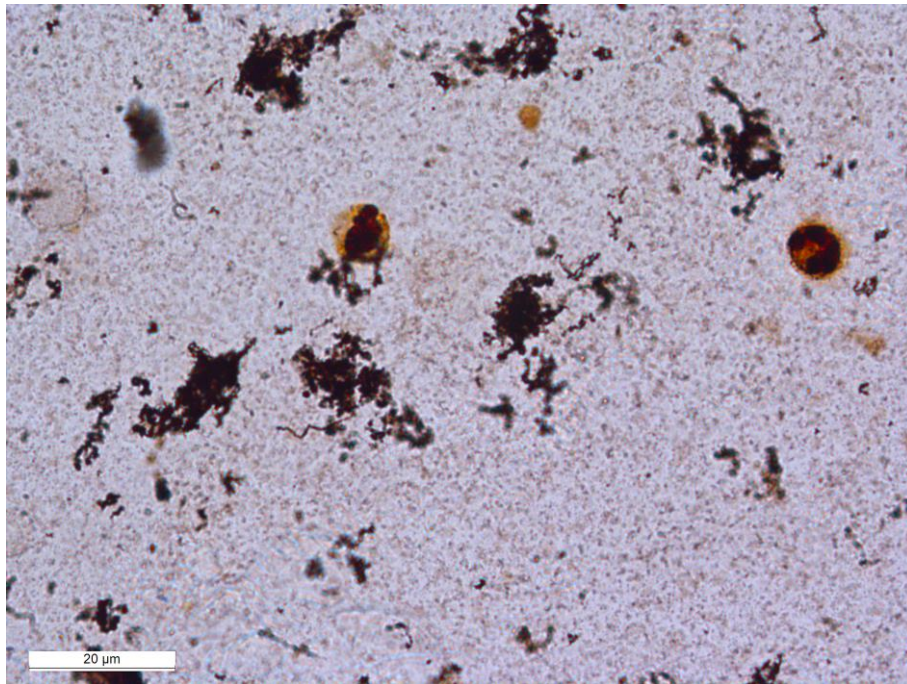
Links in der Abbildung ist eine große rundliche und bereits sehr dichte Ansammlung von Leptospiren erkennbar. Die Enden einzelner Leptospiren sind gut identifizierbar.



**Abb. IV-30:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

Diese Abbildung zeigt mehrere kleine unterschiedlich dichte Ansammlungen von Leptospiren.



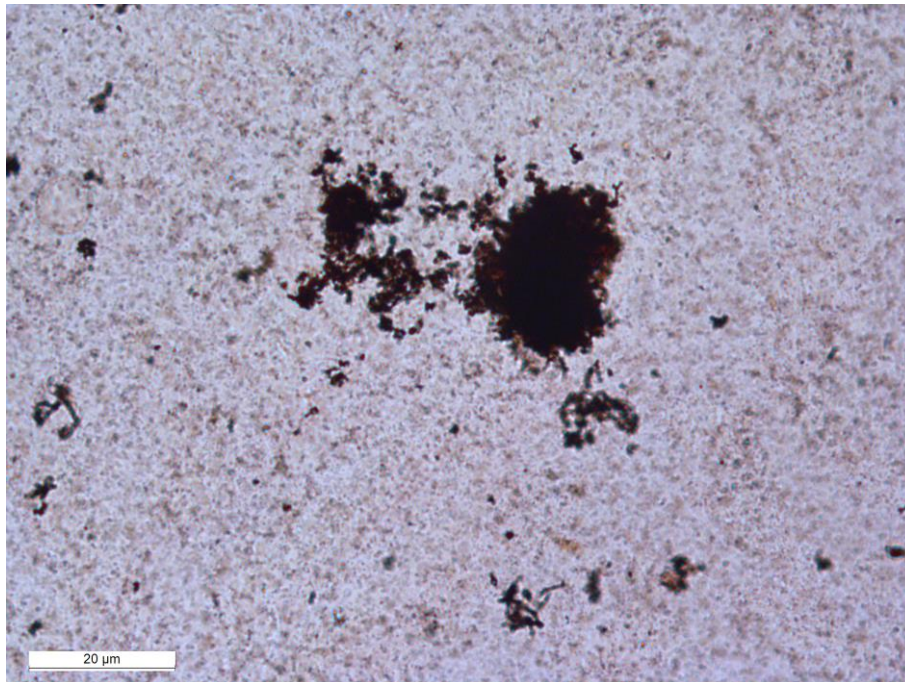


**Abb. IV-31:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

Neben den Leptospiren, die hier sowohl einzeln als auch in schon relativ dichten rundlichen Ansammlungen erkennbar sind, sind hier noch 2 neutrophile Granulozyten erkennbar.

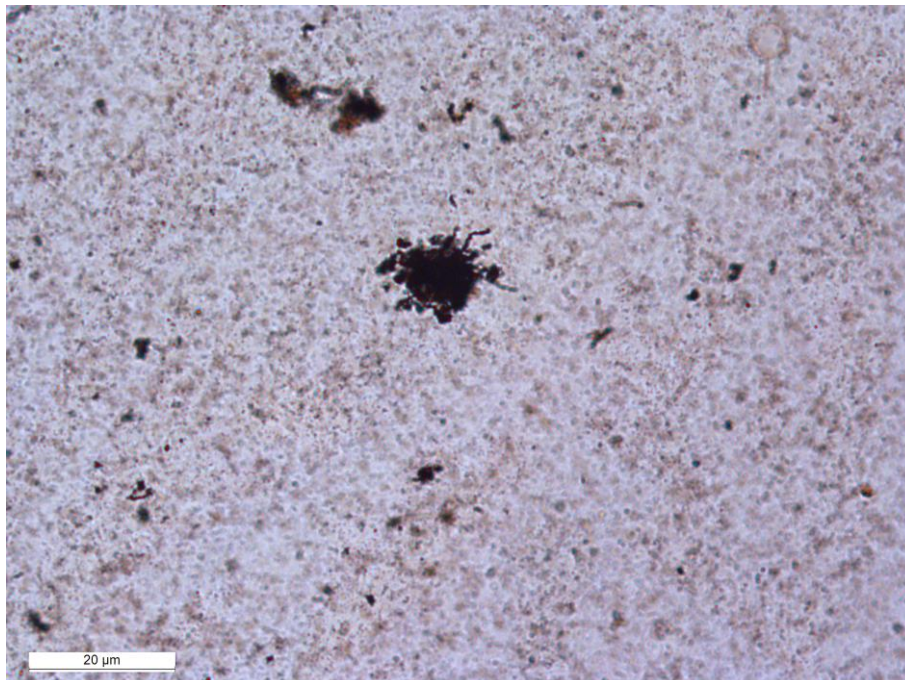
Gruppe III (ausgereifter Biofilm oder Biofilm-ähnliche Struktur):

Auf den Abbildungen der Gruppe III der Silberimprägnierung (s. Abb. 32 - 36) sind weitere Verdichtungen der gebildeten Mikrokolonien zu sehen. Die Strukturen verlieren ihre dunkelbraune Färbung und erscheinen durch die dichtere Packung des Materials schwarz. Ebenso geht die Körnung verloren. Die Strukturen formieren sich weiter und werden zu runden Gebilden (s. Abb. 36). Vereinzelt kann man auch hier erkennen, dass am Rand der runden Strukturen ein oder mehrere Enden von Leptospiren herausragen (s. Abb. 32 - 35). Es ist daher anzunehmen, dass sich die Bakterien auch innerhalb dieser Strukturen befinden.



**Abb. IV-32:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

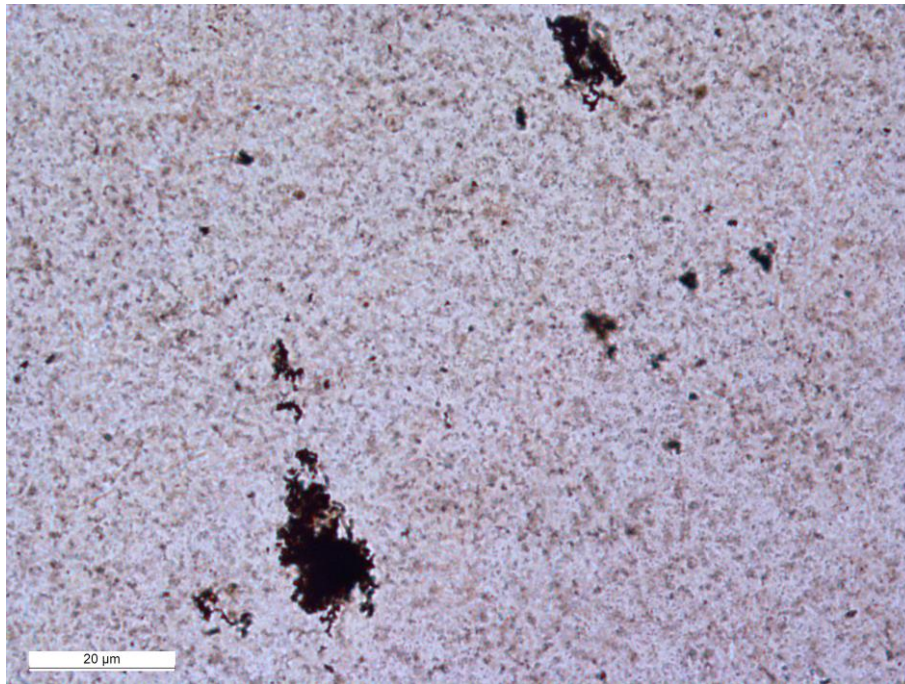
Zentral in dieser Abbildung ist eine große dichte Struktur erkennbar, einzelne Leptospiren sind randständig zu sehen.



**Abb. IV-33:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

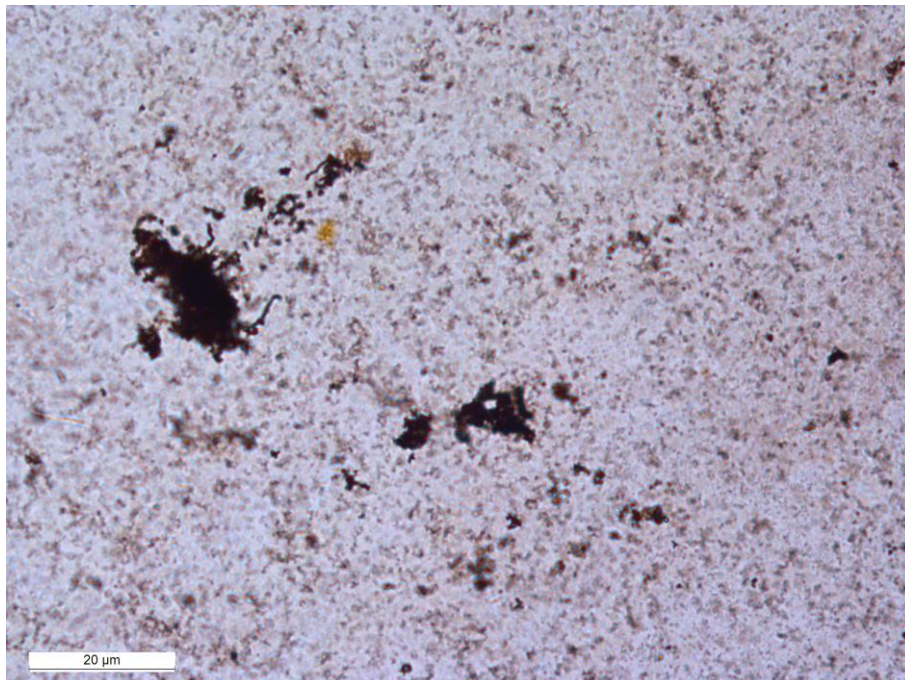
Im Zentrum dieser Abbildung ist ein rundliches dichtes Gebilde zu sehen, aus dem besonders bei „1 Uhr“ und bei „3 Uhr“ Leptospiren herausragen.





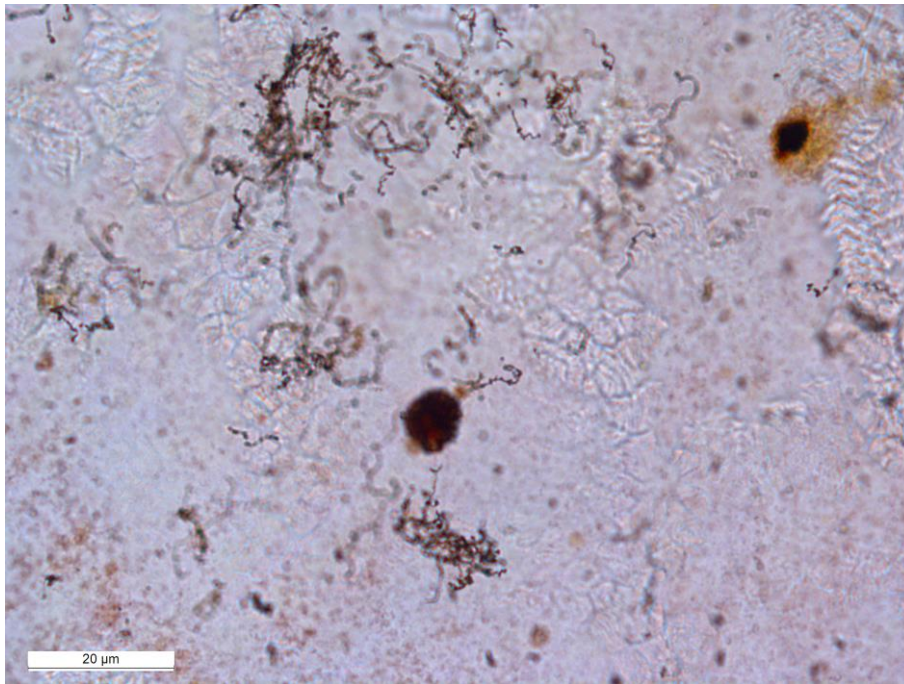
**Abb. IV-34:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

Am unteren Bildrand ist ein annähernd rundes dichtes Gebilde zu sehen, bei „6 Uhr“ ist eine einzelne Leptospire zu erkennen.



**Abb. IV-35:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

Am linken Bildrand zeigt sich ein dichtes Gebilde, auch hier ragen einzelne Leptospiren gut erkennbar hervor („1 Uhr“ u. „5 Uhr“).



**Abb. IV-36:** Vergrößerung von Abb. IV-15: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge

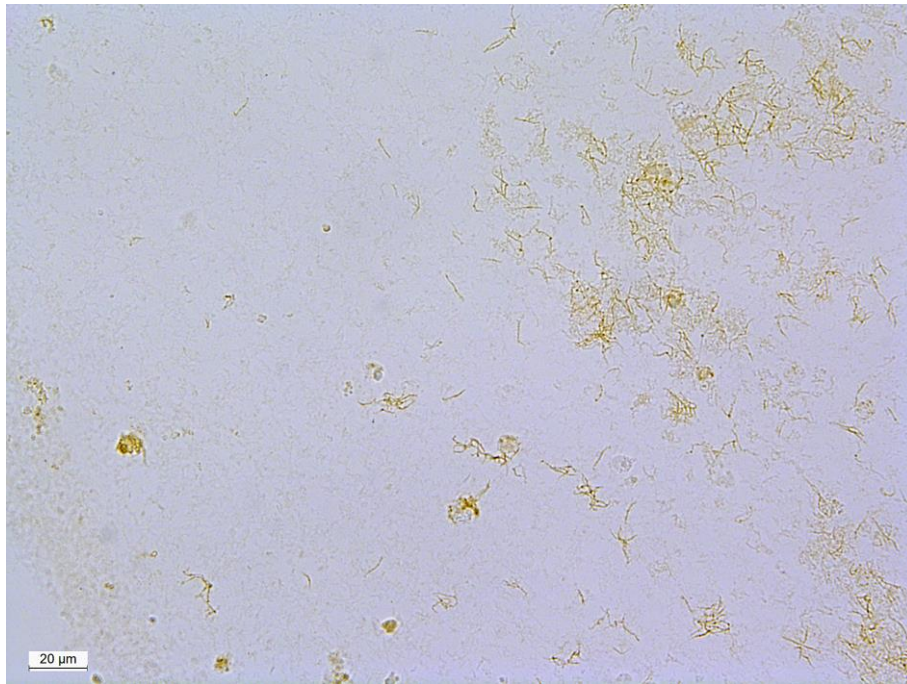
## 2.2. Immunohistochemische Färbung

Bei der immunhistochemischen Färbung erfolgte dieselbe Zuordnung zu den Gruppen (s. Kap. IV.2.).

### Übersicht:

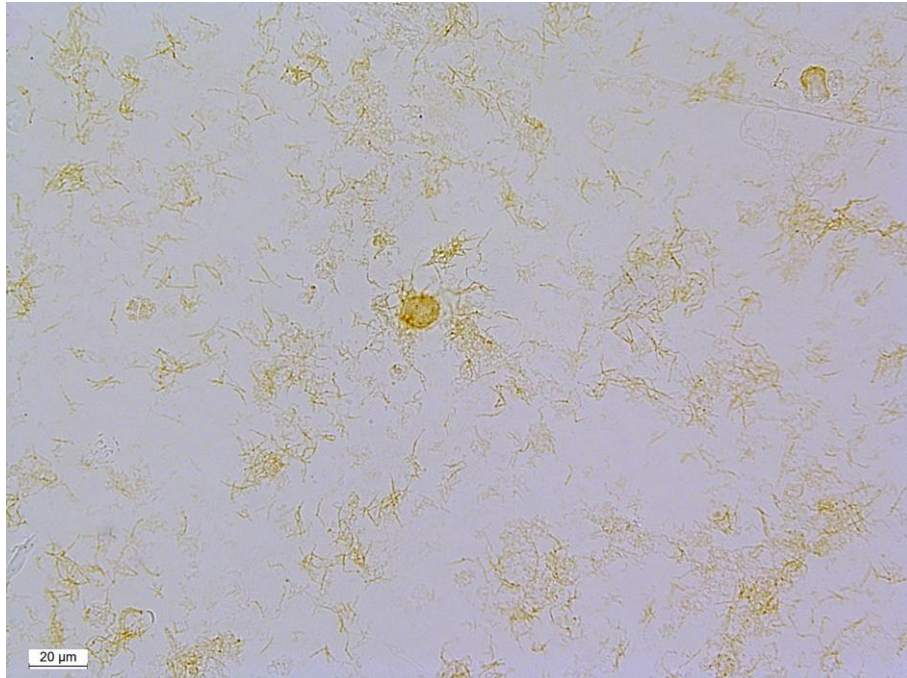
Auf den Übersichtsaufnahmen der immunhistochemischen Färbung mittels des Antikörpers gegen Oberflächenlipopolysaccharide (s. Abb. 37 u. 38) sind ebenfalls einzelne Leptospiren unterschiedlicher Länge, sowie Mikrokolonien und runde Biofilm-ähnliche Strukturen zu erkennen. Zur besseren Beurteilung sind in den folgenden Gruppen Vergrößerungen der einzelnen Strukturen abgebildet.





**Abb. IV-37:** Übersichtsaufnahme: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: mittelgradige diffuse Glaskörpertrübung mit fadenförmigen entzündlichen Einlagerungen; MAR negativ; PCR positiv

Es sind überwiegend einzelne Leptospiren, aber auch kleinere Ansammlungen von Bakterien zu erkennen.



**Abb. IV-38:** Übersichtsaufnahme: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: mittelgradige diffuse Glaskörpertrübung mit fadenförmigen entzündlichen Einlagerungen; MAR negativ; PCR positiv

Auf dieser Abbildung sind massenhaft einzelne Leptospiren, kleine Ansammlungen sowie zentral eine runde Struktur zu erkennen, aus der Leptospiren herausragen.

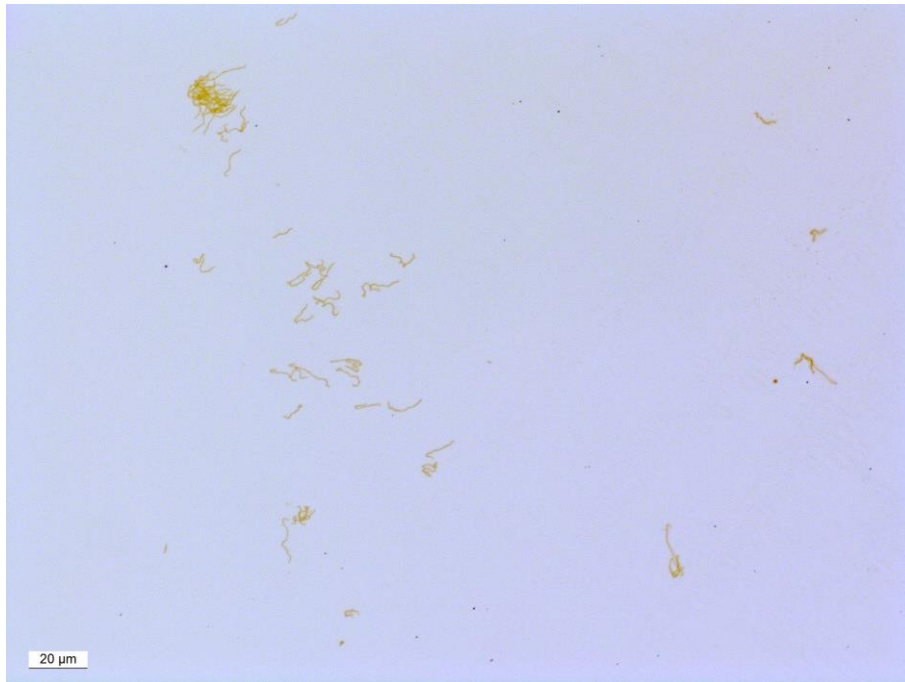
Gruppe I (einzelne Leptospiren):

Auch mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper (Anti-Leptospira rabbit antiserum) gegen Lipopolysaccharide der Oberfläche pathogener Leptospiren konnten Leptospiren in den Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen nachgewiesen werden. Auf den Abbildungen, die der Gruppe I zugeordnet wurden, sind die einzelnen Leptospiren zwischen 5  $\mu\text{m}$  bis zu ca. 20  $\mu\text{m}$  lang und zeigen unterschiedliche Formationen. Auch hier lagern sich teilweise mehrere einzelne Leptospiren aneinander oder überkreuzen sich (s. Abb. 39 u. 40). Die Morphologie der einzelnen Bakterien bleibt dabei dennoch eindeutig erkennbar.



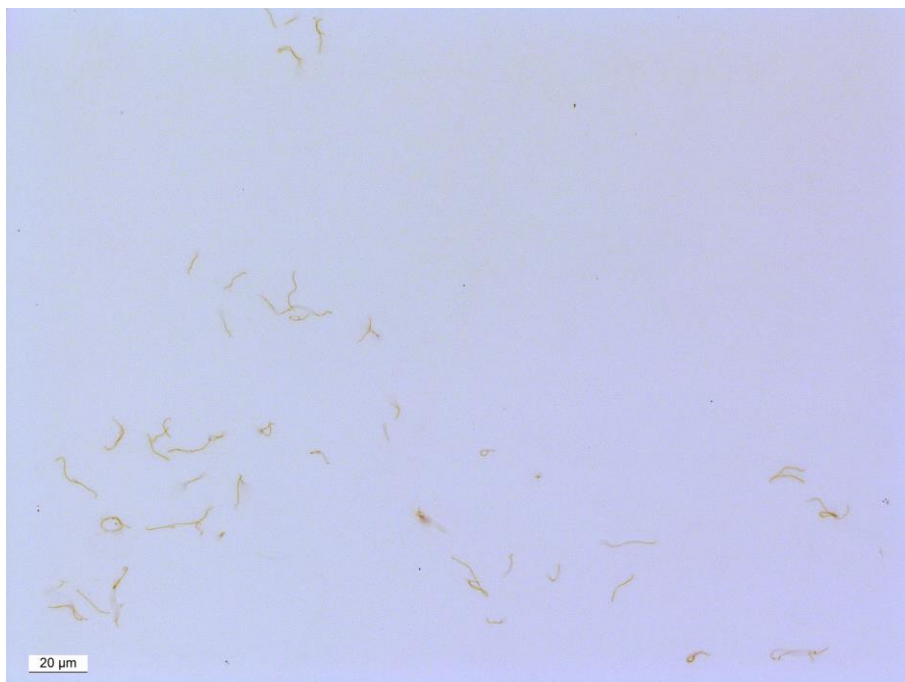
**Abb. IV-39:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; klinischer Befund: Glaskörper ohne pathologischen Befund IHC; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:400); PCR positiv

Diese Abbildung zeigt einzelne Leptospiren.



**Abb. IV-40:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; klinischer Befund: Glaskörper ohne pathologischen Befund IHC; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:400); PCR positiv

In dieser Abbildung sind sowohl einzelne Leptospiren aber auch eine kleine rundliche Ansammlung von Bakterien im linken oberen Bildrand zu erkennen.



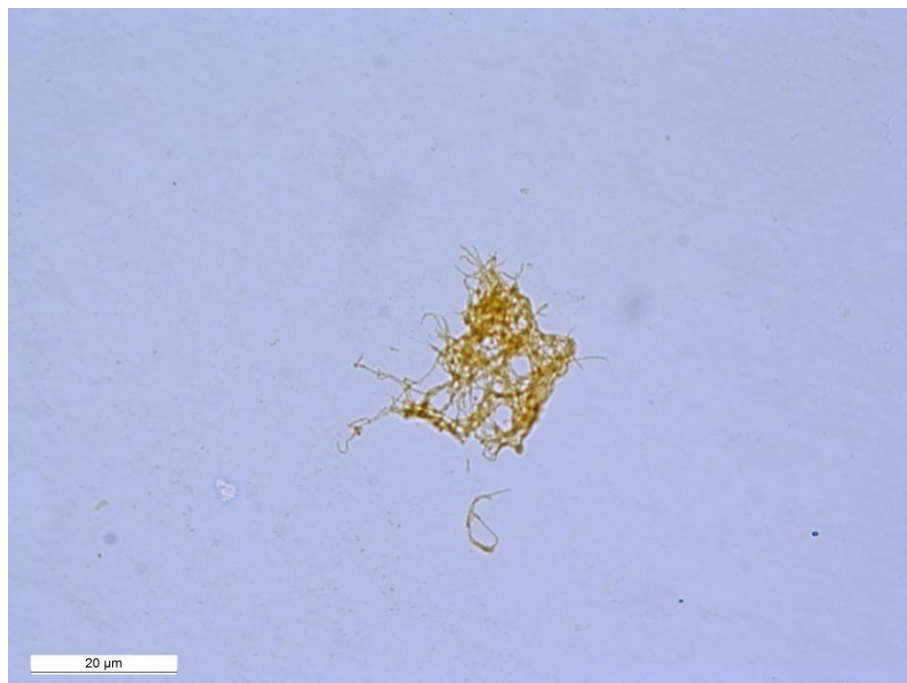
**Abb. IV-41:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; klinischer Befund: Glaskörper ohne pathologischen Befund IHC; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:400); PCR positiv

Diese Abbildung zeigt eine willkürliche Anordnung einzeln liegender Leptospiren.



Gruppe II (Leptospiren-Kluster bzw. Mikrokolonien):

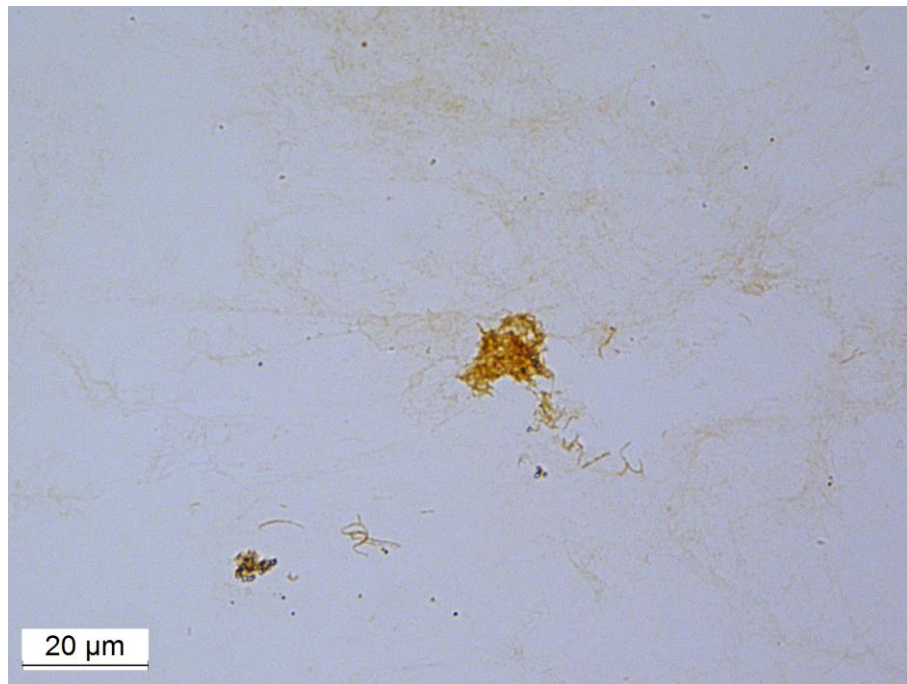
Auf den Abbildungen in dieser Gruppe ist die Formation der mittels IHC gefärbten pathogenen Leptospiren zu „Mikrokolonien“ zu erkennen. Die positiven Leptospiren liegen dicht zusammen. Einige Bereiche dieser Kolonien sind dunkler gefärbt. Dies ist ein Hinweis auf sehr dicht beieinander liegende Bakterien (s. Abb. 43), andere Bereiche sind etwas heller als Zeichen einer lockeren Konformation (s. Abb. 44). Bei den weniger dichten Konformationen sind die Leptospiren als einzelne Bakterien sehr gut zu identifizieren (s. Abb. 44). Bei den dichter gepackten Strukturen sind einzelne Bakterien nur randständig zu sehen, das in der Mitte liegende Material erscheint als homogene Masse (s. Abb. 42 u. 43).



**Abb. IV-42:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: hochgradige diffuse Glaskörpertrübung mit wolkigen Einlagerungen; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:3200); PCR positiv

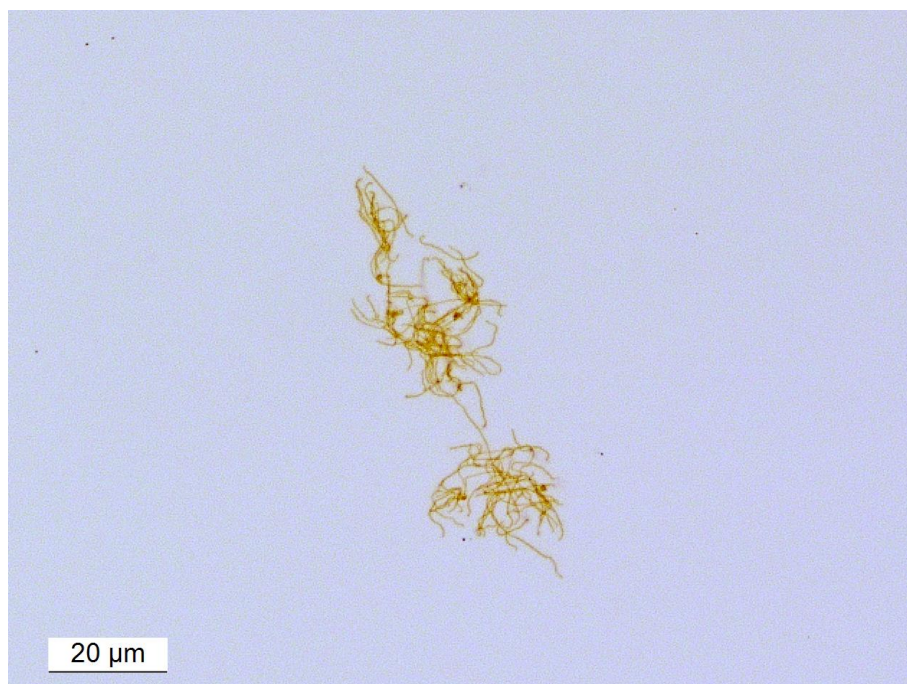
Zentral in dieser Abbildung befindet sich eine lockere Ansammlung von mehreren Leptospiren. Unterhalb dieser Ansammlung ist ein einzelnes Bakterium erkennbar.





**Abb. IV-43:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: mittelgradige diffuse Glaskörpertrübung mit dicken membranartigen Einlagerungen; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:1600); PCR positiv

Hier liegt zentral eine Ansammlung von Bakterien die schon etwas dichter erscheint. Ebenso sind einzelne Bakterien auf dieser Abbildung zu sehen.



**Abb. IV-44:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; klinischer Befund: Glaskörper ohne pathologischen Befund IHC; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:400); PCR positiv

Diese Abbildung zeigt eine lockere Ansammlung von mehreren Leptospiren.

Gruppe III (ausgereifter Biofilm oder Biofilm-ähnliche Struktur):

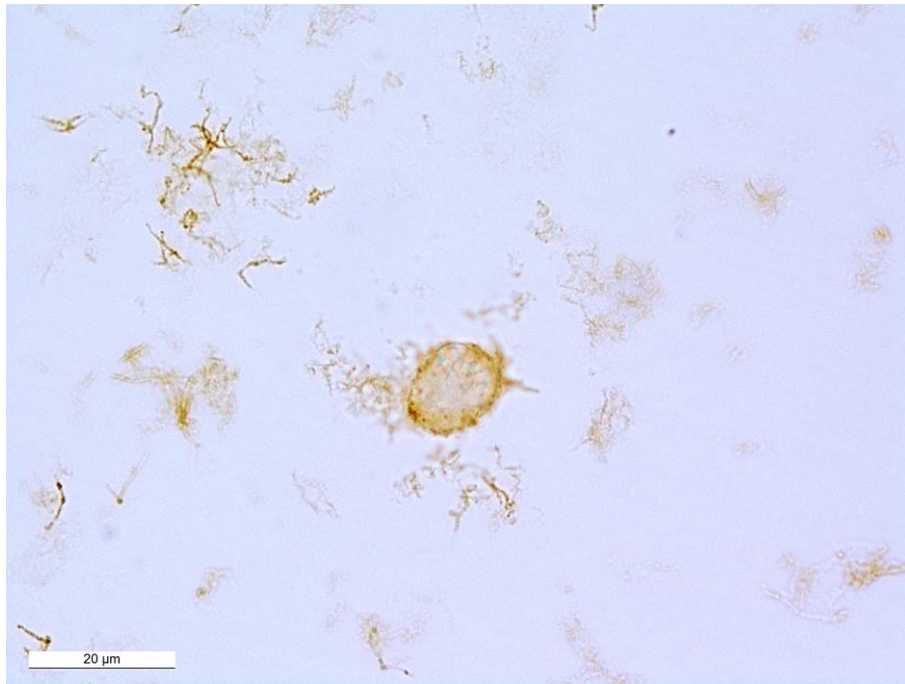
Die Abbildungen, die Gruppe III zugeordnet wurden, zeigen Leptospiren, die sich in Biofilm-ähnlicher Konformation darstellen. Da der Biofilm von den Leptospiren gebildet wird, zeigt die aus Leptospiren-Material bestehende amorphe Masse, die die Leptospiren umgibt, ebenfalls eine positive Reaktion in der immunhistochemischen Färbung. Dieses amorphe Material (=Biofilm) nimmt teilweise eine nahezu runde, kugelähnliche Form an (s. Abb. 46, 47, 52 u. 53). Dass sich darin Leptospiren befinden, zeigen einzelne Bakterien, die am Rand dieser Strukturen eindeutig zu identifizieren sind (s. Abb. 52). Die Biofilm-ähnliche Struktur liegt als „freischwimmender“ Biofilm vor.

Zu Beginn einer Biofilmbildung kann eine etwas lockerere Formation beobachtet werden (s. Abb. 51), ältere Biofilme zeigen sich viel dichter und mit eingeschlossenen Leptospiren (s. Abb. 52).

Auf Abb. 48 ist die homogene feinkörnige Struktur des Biofilms in einem frühen Stadium zu sehen. Die rundliche Morphologie kann man bereits erahnen. Ebenfalls deutlich erkennbar sind die randständigen Bakterien, die mit dieser Struktur verbunden sind, sowie weiter außerhalb dieser Struktur liegende Leptospiren, die keinen Kontakt dazu haben.

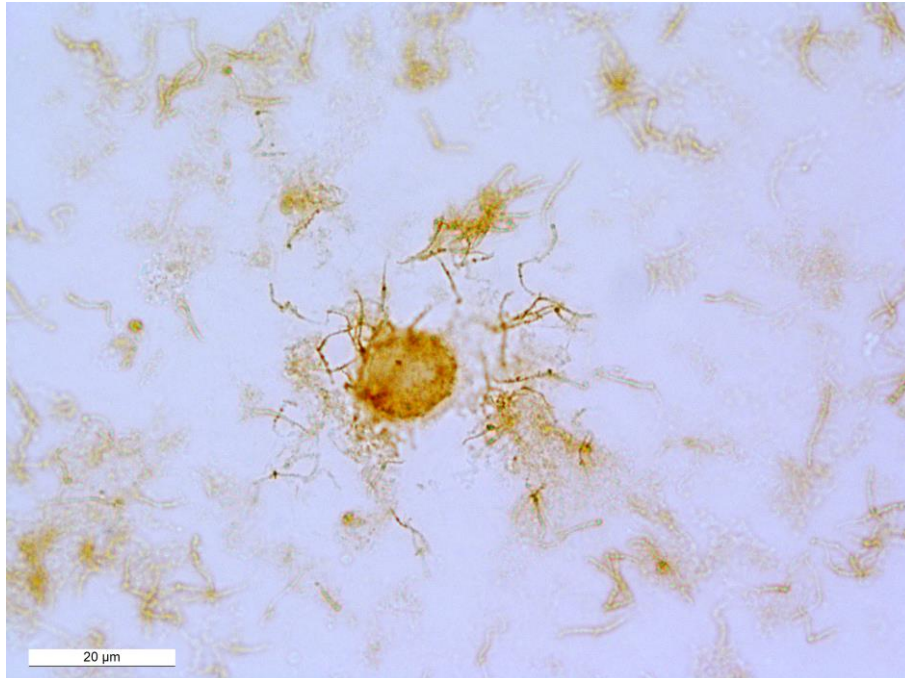
Durch die dicke dreidimensionale Struktur der Biofilmformation sind die kugelähnlichen Biofilm-Strukturen, einzelne Leptospiren dieser Formation oder die Leptospiren in der Peripherie teilweise nicht alle gleichzeitig scharf darzustellen, da sie sich auf unterschiedlichen Ebenen befinden (s. Abb. 45, 46 u. 47).

Teilweise sind die einzelnen Bakterien in den älteren und sehr dichten Biofilmkugeln nicht mehr zu erkennen, sondern nur dann, wenn ein Bakterium aus dieser amorphen Masse herausragt (s. Abb. 52). Durch den leptospiralen Ursprung des Biofilms wird er jedoch mit der gleichen Färbung, die spezifisch für Lipopolysaccharide der Oberfläche pathogener Leptospiren ist, angefärbt (s. Abb. 53). Auf Abb. 52 ist zudem die hakenförmige Endung der Leptospiren gut zu erkennen.



**Abb. IV-45:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: mittelgradige diffuse Glaskörpertrübung mit fadenförmigen entzündlichen Einlagerungen; MAR negativ; PCR positiv

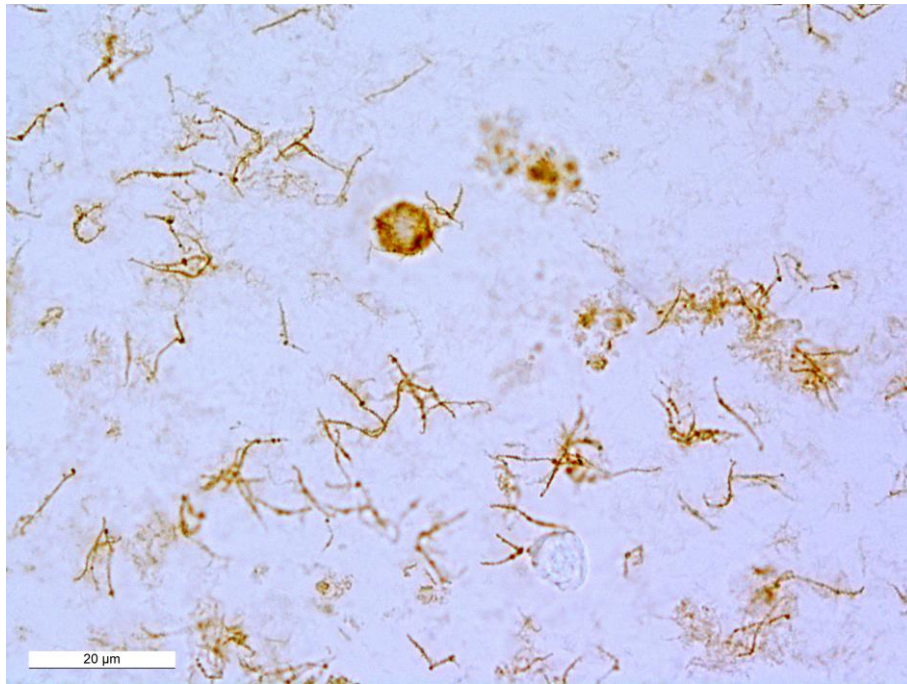
Zentral in dieser Abbildung ist eine runde Struktur zu erkennen, aus der Leptospiren herausragen mit peripher liegenden einzelnen Leptospiren.



**Abb. IV-46:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: mittelgradige diffuse Glaskörpertrübung mit fadenförmigen entzündlichen Einlagerungen; MAR negativ; PCR positiv

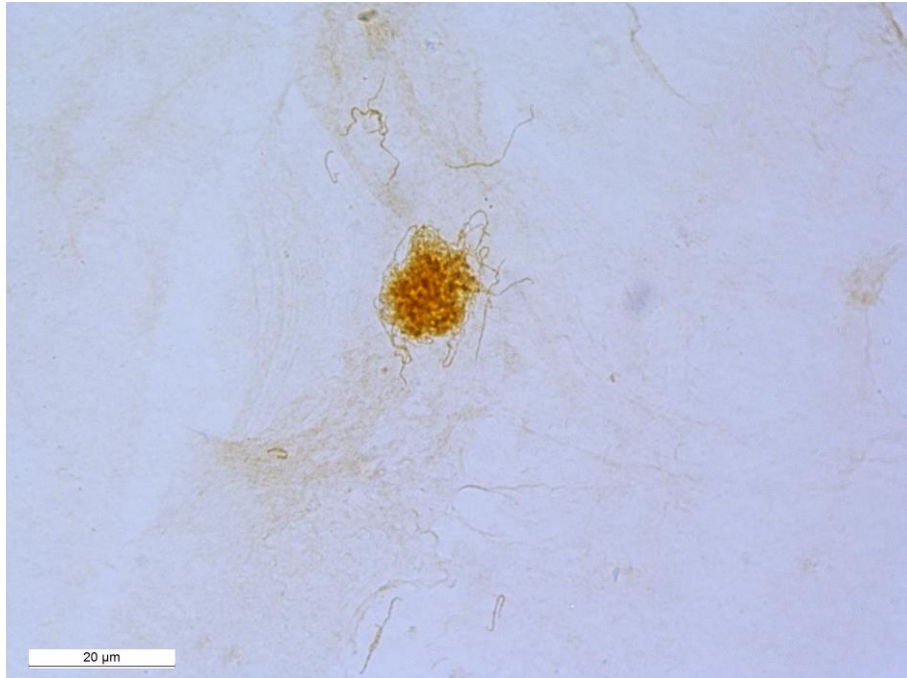
Zentral in dieser Abbildung ist ein rundes Konstrukt zu sehen aus dem Leptospiren herausragen. In der Peripherie sind viele einzelne Leptospiren erkennbar.





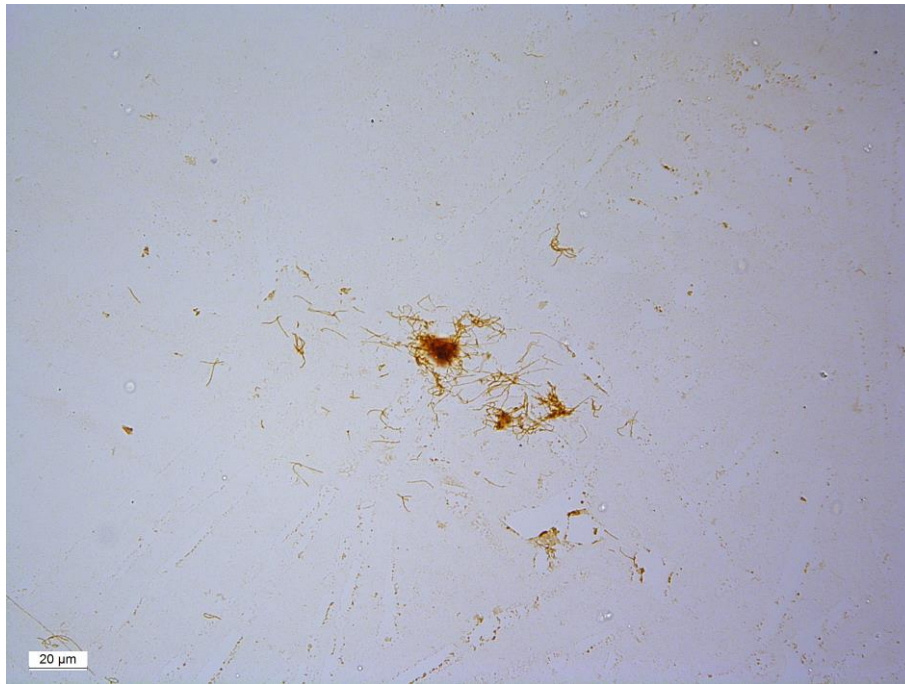
**Abb. IV-47:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: mittelgradige diffuse Glaskörpertrübung mit fadenförmigen entzündlichen Einlagerungen; MAR negativ; PCR positiv

Auf dieser Abbildung sind massenhaft einzelne Leptospiren zu erkennen, zusätzlich ein rundes Gebilde, aus dem Leptospiren herausragen.



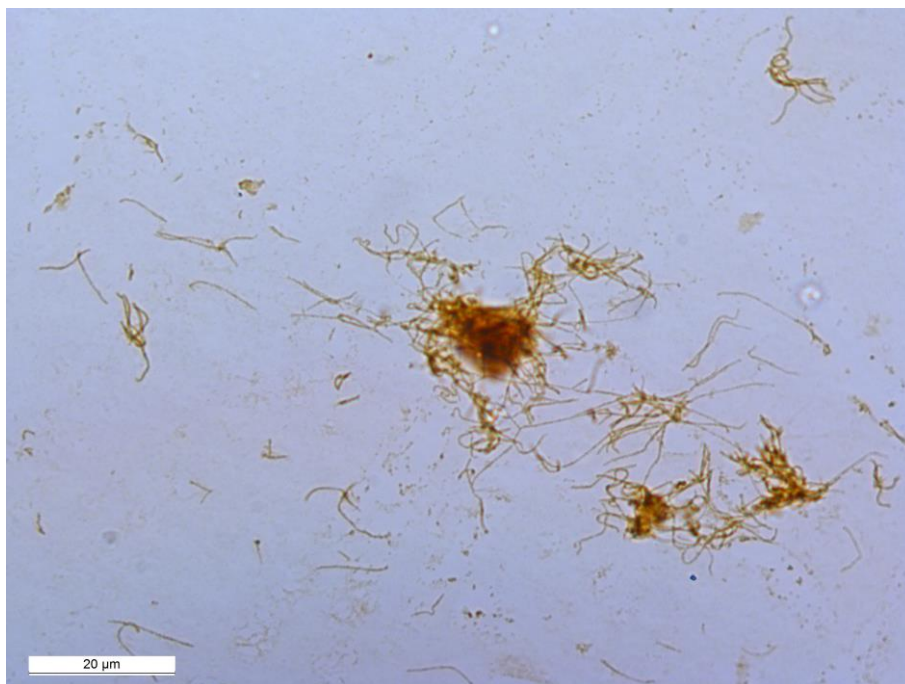
**Abb. IV-48:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: hochgradige diffuse Glaskörpertrübung mit wolkigen Einlagerungen; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippytypphosa (1:3200); PCR positiv

Zentral in dieser Abbildung ist eine dichte Struktur zu erkennen. Seitlich ragen vereinzelt Leptospiren aus dieser Struktur. Oberhalb und unterhalb liegen vereinzelt wenige Leptospiren.



**Abb. IV-49:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: hochgradige diffuse Glaskörpertrübung mit wolkigen Einlagerungen; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:3200); PCR positiv

Im Zentrum dieser Abbildung ist ein annähernd rundes Gebilde, aus dem von allen Seiten viele Leptospiren herausragen. Zusätzlich sind einzelne Leptospiren in der Peripherie verteilt zu erkennen.

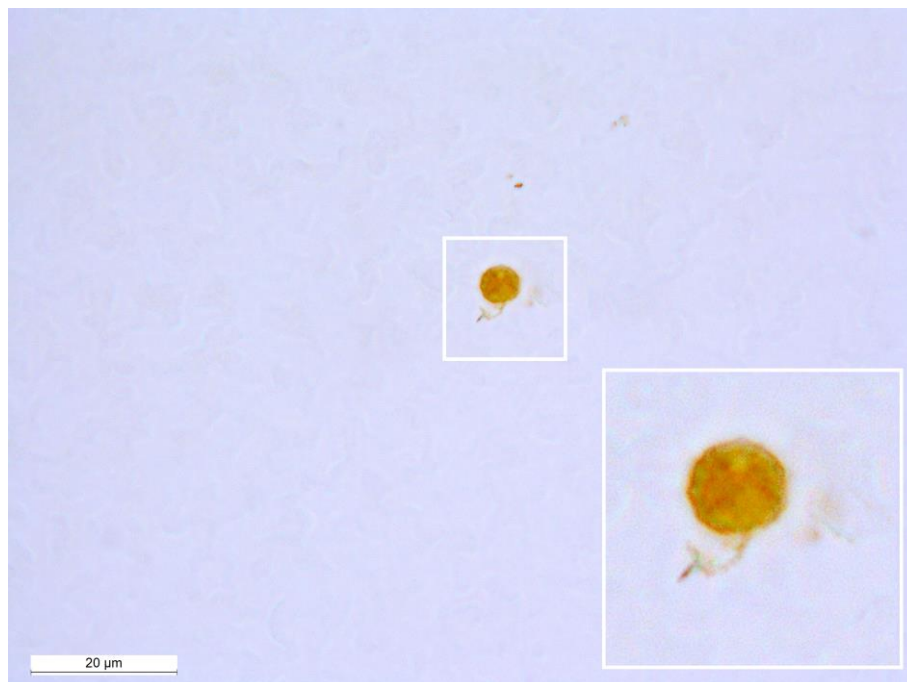


**Abb. IV-50:** Vergrößerung von Abb. IV-49



**Abb. IV-51:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: hochgradige diffuse Glaskörpertrübung mit wolkigen Einlagerungen; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:3200); PCR positiv

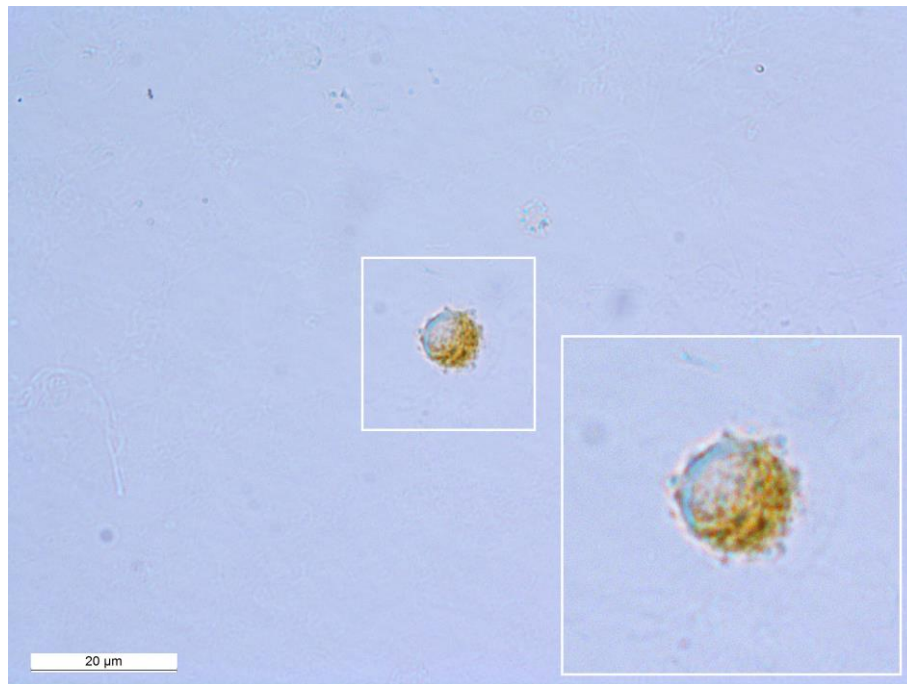
Diese Abbildung zeigt eine dichte Struktur im Zentrum, an allen Seiten ragen Enden von Leptospiren heraus. Zusätzlich liegen einzelne Leptospiren unterhalb dieser Struktur.



**Abb. IV-52:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: hochgradige diffuse Glaskörpertrübung mit hochgradigen Einlagerungen; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:3200); PCR positiv

Auf dieser Abbildung ist lediglich an einem einzelnen Bakterium das Vorhandensein von Leptospiren im Inneren dieser Struktur zu erahnen.





**Abb. IV-53:** Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: Glaskörper ohne pathologischen Befund; Sero-var mit höchstem Titer in der MAR: Australis (1:3200); PCR positiv

In der Detailansicht ist eine runde Struktur zu erkennen. Am Rand zeigen sich weitere Strukturen, die dort herausragen.

## **V. DISKUSSION**

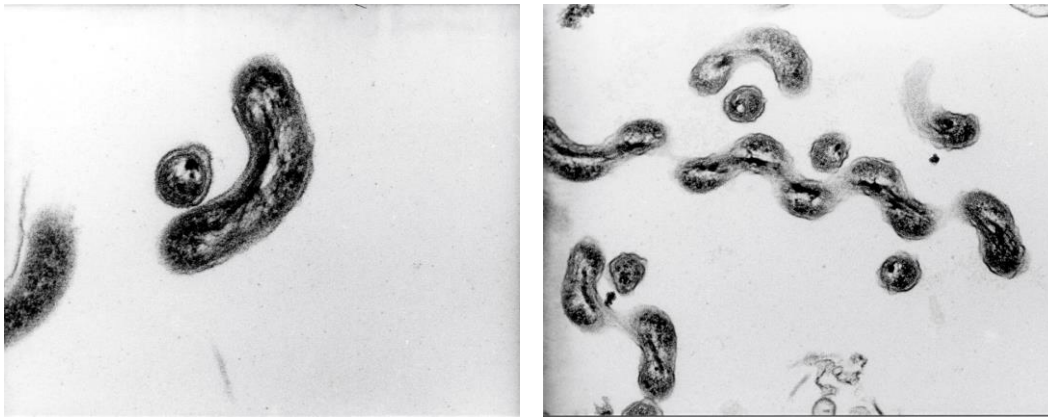
### **1. Hintergrund der vorliegenden Arbeit**

Seit Mitte des 20. Jahrhunderts gab es Hinweise darauf, dass Leptospiren ursächlich an der Entstehung der equinen rezidivierenden Uveitis beteiligt sind (Gsell et al., 1946). In den vergangenen Jahrzehnten konnte nachgewiesen werden, dass eine chronische intraokulare Leptospireninfektion bei an ERU erkrankten Pferden vorhanden ist (Faber et al., 2000, Wollanke et al., 2001, Niedermaier, 2002, Wollanke, 2002, Gesell, 2004, Wollanke et al., 2004, Niedermaier et al., 2006, Brandes et al., 2007, Roczek, 2008, Loibl, 2009, Popp et al., 2013).

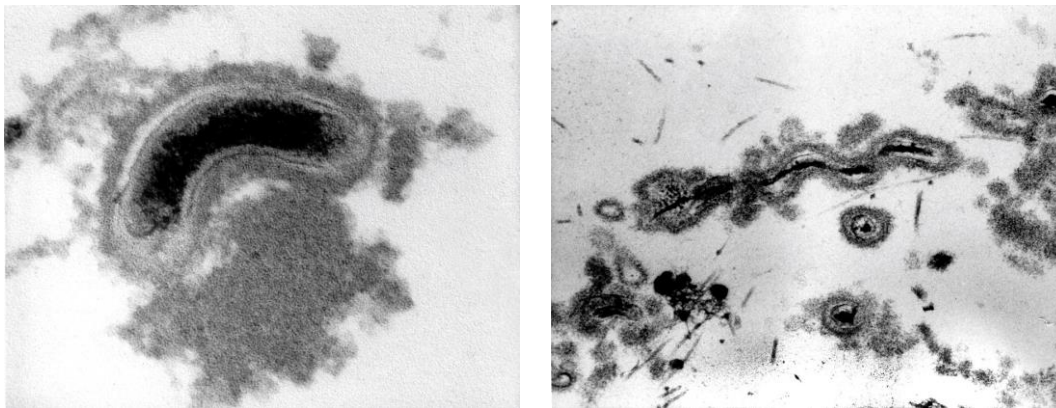
In vielen Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen sind sehr hohe agglutinierende Antikörpertiter nachweisbar. Erstaunlicherweise sind gleichzeitig mit denselben Proben erfolgreiche kulturelle Anzüchtungen von Leptospiren möglich, so dass agglutinierende Antikörper und vermehrungsfähige Bakterien nebeneinander vorkommen (Wollanke, 2002, Wollanke et al., 2004). Diese Tatsache legte den Verdacht nahe, dass die Leptospiren sich im Glaskörper erfolgreich vor dem Immunsystem schützen können. Ein Grund kann die im Glaskörperraum vorhandene „immunologische Nische“ sein. Weitere unterstützende Faktoren wie die verschiedenen im Auge physiologischerweise immer vorhandenen immunsupprimierenden Mechanismen, die bemüht sind, jede Entzündungsreaktion zu unterdrücken, können ebenfalls eine entscheidende Bedeutung für die jahrelange Leptospiren-Persistenz im Auge darstellen. Dennoch war bisher wenig über die Mechanismen bekannt, die es den Leptospiren ermöglichen, eine chronische Infektion innerhalb des Auges zu unterhalten.

Frühere transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen (Niedermaier, 2002, Niedermaier et al., 2006) haben aufgezeigt, dass die im Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden befindlichen Leptospiren von einer Schicht umgeben sind, die damals noch nicht als „Biofilm“ bezeichnet wurde. Diese Schicht ist bei den Leptospiren aus der Kultur nicht nachweisbar gewesen. Es war vermutet worden, dass diese Schicht einen Schutz vor dem Immunsystem darstellt.



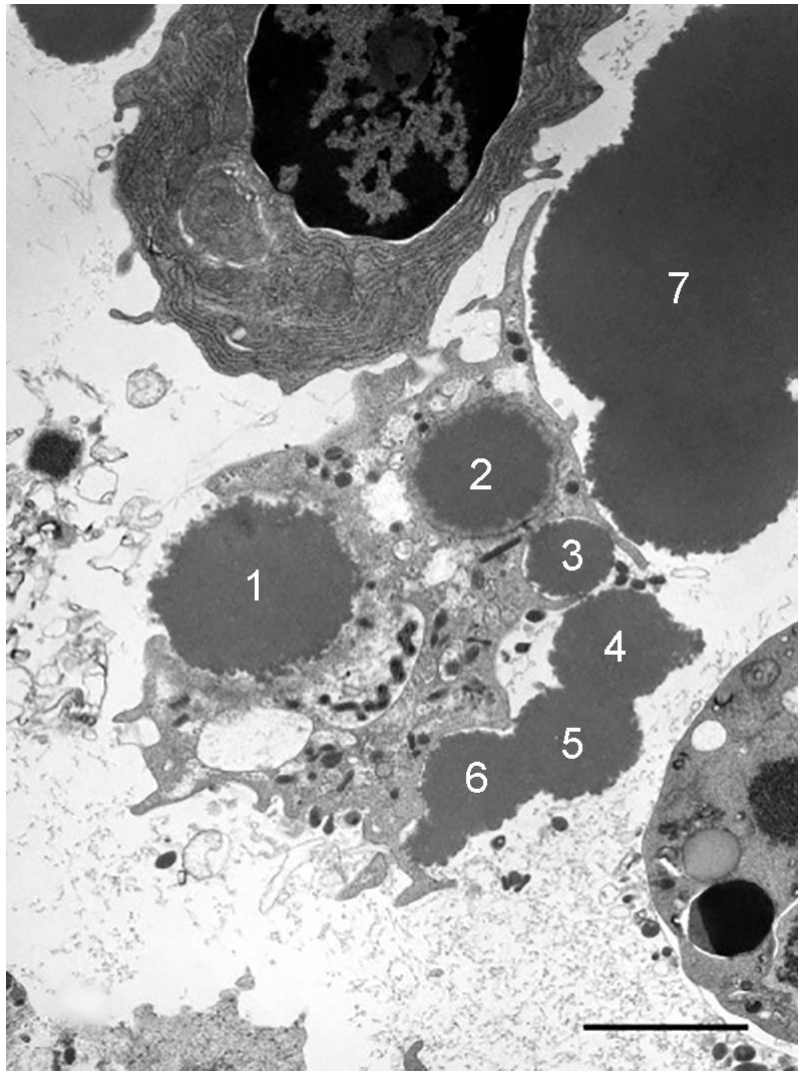


**Abb. V- 1:** Elektronenmikroskopische Darstellung von *L. Grippytyphosa* aus der Kultur, welche experimentell in den Glaskörperraum augengesunder Pferde injiziert wurden (Niedermaier, 2002).



**Abb. V-1:** Elektronenmikroskopische Darstellung von Leptospiren aus Glaskörpermaterial von an ERU erkrankten Augen (Niedermaier, 2002).

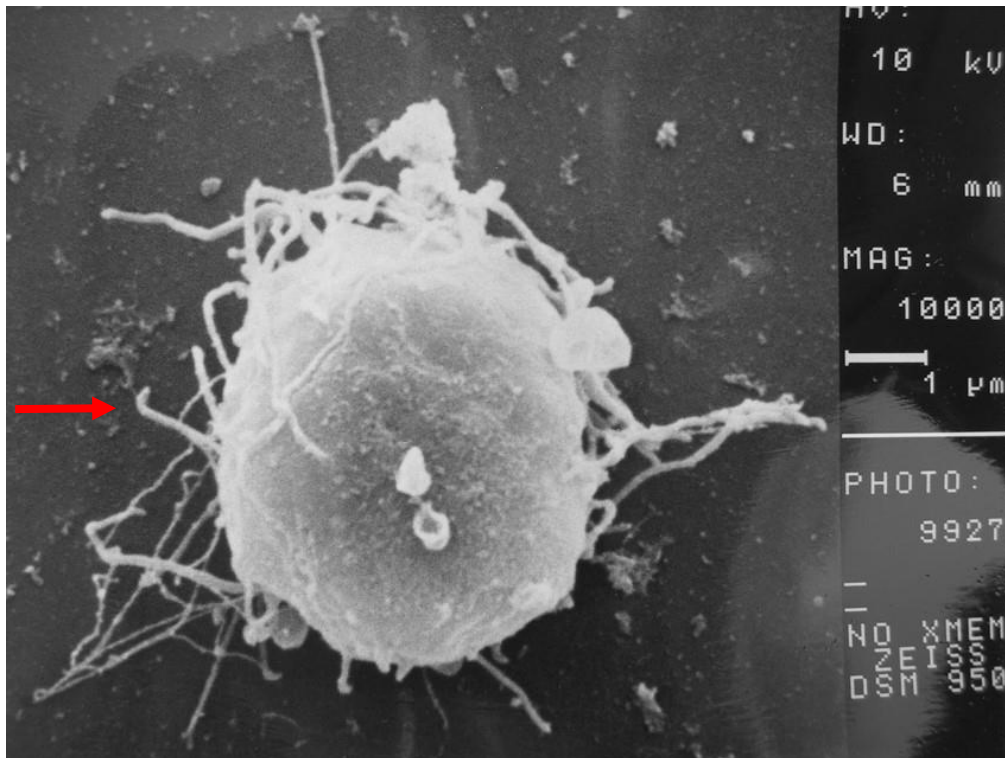
Brandes und Mitarbeiter haben dann bei weiteren transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen mit Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen eine Leptospire innerhalb eines Makrophagen gesehen (Brandes et al., 2007). Auf dieser Abbildung finden sich sehr dichte kugelige Strukturen, die nicht angesprochen wurden – die jedoch den von Ristow und Mitarbeitern publizierten Bildern von *in vitro* produziertem Leptospiren-Biofilm sehr ähneln (Ristow et al., 2008). Der Verdacht, dass es sich auch bei den kugelförmigen dichten Strukturen auf den Bildern von Brandes und Mitarbeitern um Biofilm-Konstrukte handelte, ist naheliegend.



**Abb. V-2:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von Phagozyten mit eingeschlossener Leptospire; Skala: 2µm (Brandes, 2020).

Auf dieser Abbildung ist zusätzlich ein großes Biofilm-ähnliches kugeliges Gebilde (1) fast vollständig von dem Makrophagen umgeben, weitere etwas kleinere kugelige Gebilde, (2 - 6) werden ebenfalls teilweise von dem Makrophagen umgeben (Phagozytose-Versuch?). Bei diesen kugeligen Strukturen könnte es sich um ausgereiften Leptospiren-Biofilm handeln. Im rechten oberen Bildrand deuten sich weitere große kugelige Gebilde an.

Hinzu kam ein rasterelektronenmikroskopisches Bild, welches eine dreidimensionale kugelige Struktur zeigt (Wollanke, 2020). Weil nach Leptospiren gesucht wurde, die aus der Kugel herausragenden dünnen Strukturen jedoch nicht als Leptospiren identifiziert werden konnten, war diesem Bild damals keine weitere Beachtung geschenkt worden. Mit neuen Erkenntnissen und publizierten Bildern von Leptospiren-Biofilm (Ristow et al., 2008) wurde diesem Bild jedoch eine neue Bedeutung beigemessen.



**Abb. V-3:** Rasterelektronenmikroskopisches Bild, das im Jahr 1999 mit einer unverdünnten Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Pferdeauge erstellt wurde (Wollanke, 2020).

Der Pfeil weist auf eine aus dem kugelförmigen Gebilde herausragende Struktur hin, die das für Leptospiren typische hakenförmige Ende gut erkennen lässt.

Es wird vermutet, dass es sich bei der kugelförmigen Struktur um ein ausgereiftes Biofilm-Konstrukt handelt. Größe und Morphologie dieser Struktur würden sehr gut passen. An mehreren Stellen scheinen Teile von Leptospiren aus der Struktur herauszuragen, worauf die Hakenform (s. Abb. V-4) hinweist (Wollanke, 2020).

Der Glaskörper mit seinem hohen Wassergehalt (98%) (Wollanke, 2002), einem niedrigen Proteingehalt (in gesunden Pferdeaugen  $\leq 2$  g/l) (Wollanke, 1995), den Glaskörperfibrillen (Niedermaier, 2002) und der viskösen Konsistenz (bedingt durch Hyaluronsäure und Fibrillen) ist ein ideales Medium für die Biofilm-Bildung von Leptospiren. Die Biofilm-Bildung von Leptospiren wäre wiederum eine sehr gute Erklärung für das Auftreten und den Verlauf der ERU, da die rezidivierenden Schübe, die jahrelang bestehende lokale Infektion, die insuffiziente Immunabwehr und die im Laufe der Zeit zunehmende Schädigung der angrenzenden Strukturen typische Merkmale für Infektionen sind, die mit einer Biofilm-Bildung einhergehen (Parsek u. Singh, 2003, Hall-Stoodley u. Stoodley, 2009, Geißler, 2021).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Biofilmbildung von Leptospiren im Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden nachzuweisen.

## 2. Methode

Für die vorliegende Untersuchung wurden etablierte und anerkannte Färbemethoden für Spirochaeten verwendet (Babudieri, 1961). Sowohl mittels Warthin-Starry-Färbung als auch immunhistochemisch mit Hilfe des spezifischen Antikörpers konnten erstmals zuverlässig Leptospiren in Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen nachgewiesen werden. Alle vorausgegangenen Versuche, Leptospiren immunhistochemisch in den Glaskörperproben nachzuweisen, waren nicht zufriedenstellend verlaufen (Wollanke, 2020), weshalb in früheren Untersuchungen die Elektronenmikroskopie eingesetzt wurde (Niedermaier, 2002, Brandes et al., 2007).

Die Silberimprägnierung gilt als Goldstandard zum Nachweis von Spirochaeten (Babudieri, 1961). Die Silberimprägnierung ist somit eine geeignete Methode zum Nachweis der Leptospiren in den Glaskörperproben. Sie ist mit ihrer kostengünstigen und einfachen Durchführung mit geringen finanziellen Mitteln sowie einer technischen Grundausstattung ausführbar. Alle benötigten Materialien wurden durch den Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie der tierärztlichen Fakultät der LMU zur Verfügung gestellt.

Die immunhistochemische Färbung ist durch den spezifischen Antikörper eine ideale Methode für den Nachweis von Leptospiren, sowie für den von den Leptospiren gebildeten Biofilm. Sowohl der Biofilm als auch die Leptospiren wiesen die mit der IHC markierbaren Antigene auf.

Die morphologischen Eigenschaften der Leptospiren in Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen wurden mit verschiedenen Serovaren pathogener Kulturleptospiren (mit denselben Färbemethoden) verglichen, die aus einem für sie idealen Nährmedium stammten und somit keine Veranlassung hatten, Biofilm zu bilden.

Die in der vorliegenden Arbeit erstmals zuverlässig und reproduzierbar gelungene Darstellung der Leptospiren in Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen sowie die Darstellung der verschiedenen Stadien der Leptospiren-Biofilmbildung in diesen Proben beweist, dass die für diese Arbeit verwendete Methode sehr gut geeignet war.

### **3. Interpretation der Ergebnisse**

#### **3.1. Nachweis von Leptospiren in den Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen**

Mit Hilfe beider Färbemethoden waren die Leptospiren zweifelsfrei in den Glaskörperproben darstellbar. Auf den Objektträgern waren Leptospiren entweder massenhaft oder teilweise auch sehr vereinzelt (eine einzeln liegende Leptospire in einem Sichtfeld des Mikroskops, bzw. eine Leptospire auf dem gesamten Objektträger) zu sehen. Zum Großteil waren auch komplett leere Objektträger dabei. Die Suche nach Leptospiren verlief teilweise sehr mühevoll und zeitaufwändig. Dies könnte ein Grund sein, warum vorausgegangene Untersucher, die möglicherweise weniger hartnäckig waren, hier gescheitert sind.

Der Nachweis und die Darstellung von Leptospiren in Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen gelang bereits durch vorausgegangene transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen (Niedermaier, 2002, Niedermaier et al., 2006). In derselben Arbeit konnten auch Kulturleptospiren, welche in Pferdeaugen injiziert worden waren, elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. Auch die ultrastrukturellen Details konnten mit Hilfe dieser Untersuchungsmethode abgebildet werden (Brandes et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit gelang es mit zwei weiteren Methoden erneut, Leptospiren in Glaskörpermaterial aus an ERU erkrankten Augen darzustellen.

#### **3.2. Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Warthin-Starry-Färbung und der Färbung mit Hilfe des spezifischen Antikörpers**

Da durch die üblich gebräuchlichen Färbemethoden für Bakterien Leptospiren nicht oder nur sehr schwer nachweisbar sind, stellt die Warthin-Starry-Färbung den Goldstandard zur Detektion von Spirochaeten dar (Babudieri, 1961, Blenden u. Goldberg, 1965). Durch die immunhistochemische Färbung mit spezifischen Antikörpern können die Leptospiren hingegen gezielt detektiert werden, daher ist dies die zuverlässigere und spezifischere der beiden Methoden, um das Vorkommen von Leptospiren zu beweisen. Mit beiden Methoden ist jedoch die Darstellung von Spirochaeten bzw. Leptospiren gleichermaßen möglich gewesen.

Die Biofilmbildung kann ebenfalls durch beide Methoden nachgewiesen werden. Durch die positive Reaktion des Biofilms auf den verwendeten Antikörper konnte bei der immunhistochemischen Untersuchung nachgewiesen werden, dass der gebildete Biofilm von den Leptospiren selbst produziert wird (Nachweis der gleichen Antigene) und stellt somit die zuverlässigere Methode in Bezug auf die Biofilmbildung dar.

### **3.3. Stadien der Biofilmbildung der Leptospiren im Glaskörper**

In den Glaskörperproben aus verschiedenen an ERU erkrankten Augen wurden jeweils unterschiedliche morphologische Erscheinungsbilder der Leptospiren gefunden. Es gab sowohl einzeln liegende Leptospiren (s. Abb. 16 - 20 u. 39 - 41) als auch beginnende und fortgeschrittene Aggregate von Leptospiren (s. Abb. 21 - 31 u. 42 - 44) bis hin zu mehr oder weniger dichten kugelförmigen Strukturen, in denen sich Leptospiren nachweisen ließen (s. Abb. 32 - 36 u. 45 - 52). Die Detektion der Leptospiren und ihrer unterschiedlichen morphologischen Varianz war unabhängig von der klinischen Erscheinung der ERU. Die verschiedenen beobachteten Biofilm-Ausprägungen entsprechen den Schritten in der Entstehung von Biofilm (Jamal et al., 2018) (s. Kap. II.1.2.).

Die einzeln liegenden Leptospiren stellen sowohl den ersten Schritt der Biofilmbildung dar (initialer Kontakt und Anhaftung an eine Oberfläche und / oder benachbarte Zellen), können aber ebenso die Abtrennung und Streuung von Teilen des Biofilms und Freisetzung von Bakterien zeigen, was den vierten und letzten Schritt der Biofilmbildung darstellt (s. Abb. 16 - 20 u. 39 - 41). Die einzelnen Leptospiren sind somit entweder kurz davor untereinander in Kontakt zu treten, bzw. nutzen die biotische Oberfläche, was im Falle des Glaskörpers die Glaskörperfibrillen darstellen könnten, um sich mit weiteren Bakterien zusammen zu lagern.

Der initiale Kontakt stellt eine Wechselwirkung zwischen den Leptospiren und dem Wirtsorganismus dar. Die Bindung von Leptospiren an verschiedene Wirtszellen konnte durch *in vitro*-Studien nachgewiesen werden. Die Bindungskapazität ist hierbei abhängig von der Virulenz des entsprechenden Erregers (Tsuchimoto et al., 1984, Murray, 2015). Die Leptospiren können an die extrazelluläre Matrix, wie z.B. Glykosaminoglykane, Kollagen, Fibronectin und Faserproteine binden (Murray, 2015).

Man kann außerdem beginnende und fortschreitende Aggregate von Leptospiren, sogenannte Mikrokolonien beobachten (s. Abb. 21 - 31 u. 42 - 44). Einzelne Leptospiren sind zwar noch

eindeutig zu erkennen, jedoch liegen mehrere Bakterien in „Haufen“ zusammen und bilden somit eine kleine Kolonie.

Diese Bildung von Mikrokolonien stellt den zweiten Schritt in der Entstehung eines Biofilms dar (Jamal et al., 2018) (s. Kap. II.1.2.).

Des Weiteren sind mehr oder weniger dichte und annähernd kreisförmige Strukturen abgebildet (s. Abb. 32 - 36 u. 45 - 52). Die immer noch erkennbaren Leptospiren sind von einer Masse aus amorphem Material umgeben und es entstehen neue morphologische Strukturen.

Diese Gebilde sehen der von Ristow und Mitarbeitern beschriebenen Biofilmbildung bei Leptospiren sehr ähnlich. Die Biofilmbildung von pathogenen Leptospiren konnte hier bereits *in vitro* nachweisen werden (Ristow et al., 2008). Dies stimmt mit dem dritten Schritt der Entstehung eines Biofilms überein (Jamal et al., 2018) (s. Kap. II.1.2.).

### **3.4. Vergleich der Kulturleptospiren mit den in den Glaskörperproben nachgewiesenen Leptospiren**

Die Kulturleptospiren, die aus einem für sie optimalen Nährmedium stammen, stellen sich als lange dünne Bakterien dar. Mit ihren schraubenförmigen Windungen und den hakenförmigen Enden an einer oder beiden Seiten, weisen sie die für Spirochaeten charakteristische Morphologie auf (s. Abb. IV-1 - IV-12).

Die transmissionselektronenmikroskopisch dargestellten Kulturleptospiren, welche experimentell in den Glaskörper von augengesunden Pferden injiziert wurden, weisen eine sehr ähnliche Morphologie auf. Im Querschnitt sind sie als dünne Bakterien und im Längsschnitt durch ihre charakteristischen schraubenförmigen Windungen eindeutig zu identifizieren (Niedermaier, 2002). Da sich die Kulturleptospiren nur eine kurze Zeit in einer für sie nicht optimalen Umgebung befanden, ist die Morphologie vergleichbar mit denen, die direkt aus der Kultur stammen.

Anhand der bisher einmaligen histologischen Bilder konnte mit der vorliegenden Untersuchung erstmals eine Leptospiren-Biofilmbildung *in vivo* in Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen nachgewiesen werden.

Einzeln liegende Leptospiren aus den Glaskörperproben sind geringgradig kürzer und dicker (s. Abb. 16 - 20 u. 39 - 41) als solche, die aus der Kultur stammen (s. Abb. IV-1 - IV-12). Die

Zusammenlagerung zu sogenannten Mikrokolonien zeigt, dass die Bakterien von einer amorphen Masse umgeben sind, welche durch die Leptospiren selbst produziert wurde, da diese ebenso wie die Leptospiren selbst eine positive Reaktion in der immunhistochemischen Untersuchung zeigte (s. Abb. 21 - 31 u. 42 - 44). Teilweise nehmen die Bakterienkolonien mit der gebildeten amorphen Masse eine annähernd runde Morphologie an.

Die amorphe Masse konnte schon durch transmissionselektronische Untersuchungen dargestellt werden (Niedermaier, 2002). Auch hier ist im Quer- und Längsschnitt amorphes Material zu erkennen, welches beginnt, sich um die Leptospiren anzulagern. Die runde Morphologie der Bakterien-Biofilmstruktur ist auch in vorausgegangenen transmissionselektronischen und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zu erkennen (Brandes et al., 2007, Wollanke, 2020).

Die weitere Verdichtung der Mikrokolonien und die zunehmende amorphe Masse, die auf den Bildern dieser Arbeit zu sehen ist, könnten ein ausgereiftes Biofilm-Gerüst darstellen.

Durch *in vitro* Versuche konnte bei verschiedenen pathogenen Leptospiren eine Biofilmbildung nachgewiesen werden (Ristow et al., 2008). Die Morphologie der *in vitro*-Biofilmbildung entspricht der in der vorliegenden Arbeit gefundenen *in vivo* Morphologie.

Diese morphologische Varianz der Leptospiren im Glaskörper konnte schon in früheren Untersuchungen für verschiedene Spirochaeten festgestellt werden und bestätigt, dass die typische spiralförmige Morphologie der Spirochaeten nicht die einzige Erscheinungsform ist, die diese Organismen annehmen können (Fantham, 1916, Czekalowski u. Eaves, 1954, Sapi et al., 2012).

In den Glaskörperproben wurden teilweise zystenartig abgegrenzte Strukturen beobachtet, in denen Leptospiren eingeschlossen waren. Ähnliche Gebilde konnten bei Treponemen beobachtet werden. Diese „Zysten“ waren zur „Fortpflanzung“ befähigt und es entstanden neue lebensfähige Organismen (DeLamater et al., 1950). Auch aus sog. „Granula“, welche aus Leptospirenkulturen isoliert wurden, wuchsen Einzelzellen des gleichen Organismus (Bessemans et al., 1942).

Dies spricht sehr dafür, dass die in den aktuellen Untersuchungen gefundenen kugelförmigen Gebilde keine Artefakte, Produkte der Degeneration oder des Zerfalls von Leptospiren sind. Vielmehr stellt die Bildung dieser kugeligen Strukturen ein Teil des Lebenszyklus der Leptospiren dar. Die Biofilm-Konstrukte der Leptospiren stellen sowohl ein Ruhestadium als



auch eine Form der (langsamen) Vermehrung der Bakterien unter weniger günstigen Bedingungen dar.

#### **4. Biofilmbildung im Glaskörperraum**

Leptospirenkulturen werden in speziellen Nährlösungen gehalten, in denen optimale Bedingungen für die Leptospiren bestehen. Nur so ist z.B. die Durchführung der MAR und die Beurteilung des Prozentsatzes agglutinierender Leptospiren möglich. In dieser optimalen Umgebung gibt es keinen Anlass für die Leptospiren, Biofilm zu bilden. Somit liegen sie in ihrer charakteristischen Form, als lange, dünne Bakterien mit korkenzieherartigen Windungen vor (s. Abb. IV-1 - IV-12). Der Glaskörper stellt hingegen ein nährstoffarmes Milieu dar, so dass die Leptospiren hier ungünstigere Umweltbedingungen vorfinden als in der Kultur und sich entsprechend anpassen müssen, um zu überleben. Die Biofilmbildung wird typischerweise dann initiiert, wenn die Leptospiren in einer für sie nicht optimalen wässrigen Umgebung versuchen zu überleben (Jefferson, 2004).

Durch die Biofilmbildung im Glaskörperraum gelingt es den Leptospiren, sich weitgehend sowohl vor dem Immunsystem des Pferdeauges als auch vor einer Behandlung mit Antibiotika zu schützen (Meluleni et al., 1995, Shiao u. Wu, 1998, Donlan u. Costerton, 2002). Daher liegt die Vermutung nahe, dass Leptospiren auf diese Weise jahrelang im Glaskörperraum überleben können.

#### **5. Weitere Mechanismen, die die Leptospiren-Persistenz im Glaskörperraum begünstigen können**

##### **5.1. Hämatookulare Barriere**

Die hämatookulare Barriere (= Blut-Augen-Schranke) setzt sich aus der Blut-Kammerwasser-Schranke und der Blut-Netzhaut-Schranke zusammen. Sie verhindert, dass Plasmaproteine und Entzündungsmediatoren uneingeschränkt in das Auge eindringen können (Grisanti, 1998,

Coca-Prados, 2014). Somit ist es möglich, dass sich die Leptospiren im Glaskörper aufhalten und vermehren können, ohne vom Immunsystem eliminiert zu werden.

Es kann jedoch durch traumatische oder entzündliche Prozesse zur Beschädigung der Blut-Augen-Schranke kommen. Durch den damit verbundenen möglichen Übertritt von Blutbestandteilen und Zellen ins Innere des Auges kann eine Abwehrreaktion durch körpereigene und -fremde Antigene stattfinden, die zuvor vom Immunsystem abgeschottet waren (Wollanke, 2002).

## **5.2. Der Glaskörper als „immunologische Nische“ oder immunologisch privilegierter Ort**

Das Immunsystem kann sich sowohl mit der angeborenen als auch mit der erworbenen Immunantwort gegen spezifische Antigene schützen.

Das Auge ist mit der Fähigkeit zur Regeneration beträchtlich eingeschränkt. Um sich vor schädigenden Immunreaktionen zu schützen, entwickelte sich im Auge ein immunregulatorischer Mechanismus, das „Immunprivileg des Auges“ (Grisanti, 1998). Dies beschreibt die Tatsache, dass „Fremdgewebe“ mit unterschiedlichen immunologischen Eigenschaften im Auge länger überleben können (Grisanti, 1998).

## **5.3. Immuntoleranz des inneren Auges**

### **5.3.1. Anterior chamber associated immunodeviation**

Die Vorderkammer-assoziierte abweichende Immunantwort (engl.: *anterior chamber associated immunodeviation*, ACAID) wird als abweichende Immunantwort (Kosiewicz et al., 1994) im Sinne einer systemischen antigenspezifischen Immuntoleranz bezeichnet (Grisanti, 1998).

Dies konnte an Experimenten mit Mäusen gezeigt werden. Hierfür wurden die gleichen Tumorzellen sowohl subkutan als auch in die vordere Augenkammer von Mäusen implantiert. Bei den Mäusen mit der subkutanen Implantation kam es zu Abstoßungsreaktionen durch zelluläre Immunantwort. In der vorderen Augenkammer erfolgte keine Implantatabstoßung,

sondern vielmehr eine Proliferation der Zellen. Außerdem waren im Serum dieser Mäuse zytotoxische T-Zellen, sowie antigenspezifische Antikörper nachweisbar (Ksander et al., 1992, Grisanti, 1998).

### **5.3.2. Vitreous chamber associated immunodeviation**

Auch für den Glaskörper- und Subretinalraum konnte eine abweichende Immunantwort gezeigt werden (= Glaskörper-assoziierte abweichende Immunantwort, engl.: *vitreous chamber associated immunodeviation*) (Jiang u. Streilein, 1991, Jiang et al., 1994). Auch hier konnte an einem Experiment mit Mäusen, nach Injektion eines Antigens in den Glaskörper, eine verringerte Immunantwort beobachtet werden (Sonoda et al., 2005). Diese verringerte Abwehrreaktion konnte jedoch nicht bei akutem Entzündungsgeschehen, einer beschädigten Kornea oder bei direkter Applikation der Antigene in die Blutgefäße beobachtet werden (Sonoda et al., 2005).

Die unter 5.3. beschriebenen Aspekte geben Grund zur Annahme, dass die Leptospiren, welche in den Glaskörper eingedrungen sind, durch die Immunsuppression im Auge nicht oder nur unzureichend vom Immunsystem eliminiert werden können. Somit können die Leptospiren, die im Glaskörper persistieren und die rezidivierenden Entzündungsschübe hervorrufen.

### **5.4. Besonderheiten der Grenzflächengewebe = Locus minoris resistentiae**

Avaskuläre Organbestandteile von Augen, Nieren, Gelenken, Herzklappen, Arterien und der Haut haben keine entzündliche Abwehrbereitschaft, die an Gefäß- und Bindegewebsstrukturen gebunden ist. Keime können diese Bestandteile von Organen leicht besiedeln und dort persistieren. Durch unterschiedliche Erregervirulenz und genetische Disposition fallen die Wechselwirkungen zwischen Erreger und Gewebe sehr individuell aus (Schulz u. W., 1989). Die hämostatischen Prozesse an den Endstromgebieten spielen bei rheumatoiden Erkrankungen eine entscheidende Rolle, wobei das Auge oft mitbetroffen ist (Schulz u. W., 1989).

Somit ist es bei einer systemischen Leptospirose möglich, dass Bakterien vom Endstromgebiet des Ziliarkörpers in das innere Auge gelangen. Da das Auge eine immunologische Nische darstellt (s. Kap.V.5.2.) können diese Antigene an immunprivilegierten Orten im Organismus

länger überleben. Die Persistenz der Leptospiren im Glaskörperraum verleiht der ERU ihren chronisch-rezidivierenden Charakter.

## **6. Bedeutung des Nachweises der Biofilmbildung für die ERU**

### **6.1. Chronisch rezidivierende Uveitis**

Im Jahr 2012 postulierten Hall-Stoodley und Mitarbeiter, dass bei allen chronisch rezidivierend verlaufenden Infektionen von einer Biofilm-assoziierten Infektion ausgegangen werden soll (Hall-Stoodley et al., 2012). Da sich Biofilm-Infektion in erster Linie durch ihre progressive Pathologie sowie persistierende Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe auszeichnen (Høiby et al., 2015), können hier Parallelen zum Krankheitsverlauf der ERU gezogen werden.

Die akuten Entzündungsschübe der ERU sind häufig mit erheblichen Schmerzen und einer Abwehrtrias verbunden. Nach einem abgeklungenen akuten Entzündungsschub und ggf. erfolgreicher konservativer Therapie (s. Kap. II.2.5.) treten im weiteren Krankheitsverlauf die Entzündungsschübe immer wieder und oft in immer kürzeren Intervallen auf. Diese Entzündungsschübe hinterlassen irreversible Schäden am inneren Auge, die schließlich zu erheblichen Synechien, Kataraktbildung, Netzhautablösung und Phthisis bulbi und damit zur irreversiblen Erblindung des betroffenen Auges führen können. Der chronisch-rezidivierende Krankheitsverlauf und die chronische intraokulare Leptospireninfektion sprechen dafür, dass es sich auch bei der ERU um eine Biofilm-assoziierte Infektion handelt.

### **6.2. Jahrelange Persistenz**

Die jahrelange Persistenz der Bakterien in Biofilm ist ein weiterer Punkt, der auf das Krankheitsbild der ERU übertragen werden kann. So konnte in einer klinischen Studie gezeigt werden, dass zwischen einer Leptospireninfektion und dem Auftreten klinischer Symptome (im Sinne einer Uveitis) Monate bis Jahre liegen können (Williams et al., 1971). Durch Kultivierung von Glaskörpermaterial von an ERU erkrankten Pferden gelang es bei einem Pferd, das bereits

seit 7 Jahren an einer ERU litt und in diesem Zeitraum 21 Entzündungsschübe durchgemacht hatte, Leptospiren mit einer Glaskörperprobe aus diesem Auge anzuzüchten (Wollanke, 2002).

Biofilm wird definiert als Zellaggregat, das von EPS mikrobiellen Ursprungs umgeben ist (Flemming u. Wingender, 2010). Dieses Zusammenlagern der Bakterien und die Produktion einer schützenden „Hülle“ könnte unter anderem ein überlebenswichtiger Mechanismus sein. Durch diese Biofilm-„Hülle“ können sich Leptospiren vor ablaufenden Immunreaktionen schützen. Die Leptospiren in Biofilm werden vom Immunsystem durch ihre „Maskierung“ nicht oder nur unzureichend erkannt oder innerhalb der Biofilm-Strukturen auch gar nicht erreicht und können somit nicht effektiv eliminiert werden.

## **7. Fazit**

Es ist mit der vorliegenden Arbeit erstmals gelungen, die von Jamal et al. beschriebenen Schritte der Biofilmbildung von Leptospiren *in vivo* in Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen morphologisch darzustellen. Damit ist ein weiterer und ganz entscheidender, bisher jedoch unberücksichtigter Faktor der Ätiopathogenese der ERU gefunden worden. Die Biofilmbildung erklärt, warum die mechanische Spülung des Glaskörperraumes (Vitrektomie) die effektivste Möglichkeit darstellt, die Infektion aus dem Auge zu beseitigen und damit weiteren Entzündungsschüben vorzubeugen. Es erklärt auch, warum andere lediglich immunsuppressiv wirkende Behandlungsansätze (Gilger u. Michau, 2004, Gilger et al., 2006), sowie die Behandlung mit Antibiotika (Popp et al., 2013, Fischer et al., 2019) keine langfristige Lösung darstellen. Die Eliminierung der im Biofilm befindlichen Leptospiren ist mit Ciclosporin nicht möglich und mit der Gentamicin-Injektion weniger zuverlässig im Hinblick auf die im Biofilm befindlichen Leptospiren (Hoyle u. Costerton, 1991, Duguid et al., 1992, Hoyle et al., 1992, Suci et al., 1994).

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

### Einleitung

Die Bildung von Biofilm konnte bereits für viele chronisch verlaufende bakterielle Infektionen nachgewiesen werden. Da Bakterien in einem Biofilm länger überleben können als solche ohne Biofilm, spielt dieses Phänomen eine bedeutende Rolle in der Medizin. Durch die Fähigkeit der Biofilmbakterien sich vor äußeren Einflüssen, wie z.B. antimikrobiellen Wirkstoffen oder dem Immunsystem zu schützen, erlangen Krankheiten ihren chronischen und progressiven Verlauf.

Bei der Equinen rezidivierenden Uveitis konnten Parallelen im Krankheitsverlauf, der Diagnostik und im Therapieansatz zu denen Biofilm-assoziiierter Infektionen aufgezeigt werden. Zudem konnte die Biofilmbildung für Leptospiren *in vitro* nachgewiesen werden.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Biofilmbildung bei der leptospirenbedingten Uveitis *in vivo* im Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden nachzuweisen. Hierfür wurde die Morphologie pathogener Kulturleptospiren mit der Morphologie von Leptospiren in Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen mit Hilfe zweier Färbemethoden verglichen.

### Material und Methoden

149 Glaskörperproben von 139 Pferden wurden im Zuge der therapeutisch indizierten Vitrektomie von an ERU erkrankten Pferden gewonnen. Davon waren 79 Glaskörperproben von 76 Pferden in der quantitativen real-time PCR gegen das *lipL32*-Gen pathogener Leptospiren positiv getestet worden. Die PCR-positiv getesteten Glaskörperproben, die drei Negativkontrollen, sowie sechs verschiedene Serovare pathogener Kulturleptospiren wurden auf Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet und mit Hitze fixiert.

Die Objektträger mit den Kulturleptospiren, den Glaskörperproben und den Negativkontrollen wurden zunächst für die Silberimprägnierung mit einem modifizierten Protokoll nach Warthin-Starry gefärbt. Zusätzlich wurde eine immunhistochemische Färbung mittels eines Primärantikörpers (Anti-Leptospira rabbit antiserum) durchgeführt, der sich gegen Oberflächenlipopolysaccharide pathogener Leptospiren richtet.

### Ergebnisse

Die sechs verschiedenen Serovare der pathogenen Kulturleptospiren konnten durch die Silberimprägnierung nach Warthin-Starry sichtbar gemacht werden und zeigten bei der immunhistologischen Färbung mit Hilfe des Antikörpers (Anti-Leptospira rabbit antiserum)

eine positive Reaktion. Die Kulturleptospiren zeigten sich in ihrer für Spirochaeten charakteristischen Morphologie als lange dünne und korkenzieherartig gewundene Bakterien mit der typischen hakenförmigen Endung an einer oder beiden Seiten. Auch in den Glaskörperproben aus ERU erkrankten Augen konnten mit denselben histologischen Methoden Leptospiren sichtbar gemacht werden. Die Leptospiren konnten auch hier anhand ihrer charakteristischen Morphologie, sowie durch die Reaktion mit dem Antikörper eindeutig als solche identifiziert werden. Ebenso konnten im Gegensatz zu den Kulturleptospiren neue, annähernd runde Strukturen dargestellt werden, die sowohl aus Leptospiren selbst als auch von umgebendem amorphem Material bestehen, welches von den Bakterien produziert wurde.

### **Fazit**

Die Biofilmbildung von Bakterien ist an vielen chronisch-infektiös verlaufenden Krankheiten beteiligt. Der chronisch progressive Verlauf der ERU ist ein Hinweis darauf, dass die Bakterien durch die Bildung von Biofilm vor der Eliminierung durch das Immunsystem geschützt sind. Im Vergleich mit den Kulturleptospiren zeigen die Leptospiren aus Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen eine deutlich andere Morphologie. Die Leptospiren sind nicht nur dicker, sie lagern sich auch zu kleineren oder größeren Zellklustern, sog. Mikrokolonien zusammen und sind von amorphem Material umgeben, welches von den Bakterien selbst produziert wurde. Diese neuen morphologischen Erscheinungen sehen wie die in der Literatur beschriebenen Biofilmbildungen von pathogenen Leptospiren aus.

Die Sonderstellung des Auges als immunologisch privilegierter Ort kann die chronische Infektion im Glaskörperraum und die unzureichende Eliminierung durch das Immunsystem zusätzlich begünstigen.

Der Nachweis der Biofilm-Bildung im Glaskörper aus an ERU erkrankten Augen stellt einen neuen und ganz entscheidenden Beitrag zur Ätiopathogenese der ERU dar. Die Leptospiren-Biofilmbildung im Glaskörperraum erklärt viele Unklarheiten und Unstimmigkeiten in vorausgegangenen Untersuchungen zur ERU. Zudem könnte diese *in vivo*-Biofilmbildung auf andere chronische Erkrankungen in der Tier- und Humanmedizin übertragen werden und dazu beitragen, die Behandlung dieser Krankheiten entscheidend zu verbessern.



## VII. SUMMARY

### Introduction

The formation of biofilm has already been verified for chronic bacterial infections. Since bacteria in biofilm can survive for a longer period than without, this phenomenon plays a major role in medicine. Due to the ability of biofilm bacteria to protect themselves from external influences, such as antimicrobial agents or the immune system, bacterial diseases achieve their chronic and progressive course.

The equine recurrent uveitis (ERU) shows parallels to biofilm-associated infections regarding course of disease, diagnostic and therapeutic approach. Furthermore *in vitro* biofilm formation for *Leptospira* species was proven.

Aim of this study is to verify the *in vivo* formation of biofilm of leptospires in the vitreous body in horses suffering from ERU. Therefore, two staining methods are used to compare the morphology of pathogenic culture leptospires to the morphology of leptospires from vitreous body samples of horses suffering from ERU.

### Materials and methods

149 vitreous body samples were collected from 139 horses suffering from ERU during therapeutically indicated vitrectomy. 79 of these samples from 76 horses were tested positive with quantitative real-time PCR for the *lipL32* gene of pathogenic leptospires. The PCR-positive samples from vitreous bodies, the three negative controls and six different serovars of pathogenic culture leptospires were spread on microscope slides, air dried and fixed with heat.

The culture leptospires, vitreous body samples and negative controls on microscope slides were stained according to a modified Warthin-Starry protocol for silver staining. Additionally, immunohistochemistry staining was performed using a primary antibody (anti-leptospira rabbit antiserum) that targets the surface lipopolysaccharide of pathogenic leptospires.

### Results

The six serovars of pathogenic culture leptospires could be detected with silver staining according to Warthin-Starry. They showed a positive reaction with the immunohistochemical staining with the antibody (anti-leptospira rabbit antiserum). The culture leptospires were visualized with their characteristic morphology for spirochaetes as long, thin and helically coiled bacteria with the typical hook shape on one or both endings. The same histological

methods visualized leptospire of the vitreous body samples collected from horses suffering from ERU. Leptospire were also identified based on the characteristic morphology and the reaction with the antibody. Contrary to the culture leptospire, additional new, almost round structures were detected, consisting of leptospire and surrounding amorphous material, produced by the bacteria.

### **Conclusion**

The biofilm formation of bacteria is involved in many chronically infectious diseases. The chronic progressive course of ERU is an indicator that bacteria are protected from elimination by the immune system due to the formation of a biofilm. In comparison to culture leptospire, leptospire from vitreous body samples show differing morphologies. The leptospire from samples of the vitreous body are thicker, they accumulate in cell clusters of different sizes, so called micro-colonies, and are surrounded by amorphous material, which is produced by the bacteria. These new morphological appearances look like biofilm formation of pathogenic leptospire documented before in the literature.

The immune privilege of the eye can further promote the chronic infection in the vitreous cavity and insufficient elimination by the immune system.

The verification of biofilm formation in the vitreous body of horses suffering from ERU represents a new and crucial contribution for the etiopathogenesis of ERU. The biofilm formation of leptospire in the vitreous body explains many uncertainties and discrepancies in previous studies of ERU. Additionally, the results of the *in vivo* biofilm formation can be transferred to other chronic diseases in veterinary and human medicine and contribute to significantly improve the treatment of diseases.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Adler, B. and de la Peña Moctezuma, A. (2010). "Leptospira and leptospirosis." Vet Microbiol **140**(3-4): 287-296; 10.1016/j.vetmic.2009.03.012

Adler, B., Murphy, A. M., Locarnini, S. A. and Faine, S. (1980). "Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay." J Clin Microbiol **11**(5): 452-457; 10.1128/jcm.11.5.452-457.1980

Alban, P. S., Johnson, P. W. and Nelson, D. R. (2000). "Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*." Microbiology **146** ( Pt 1): 119-127; 10.1099/00221287-146-1-119

Allan, K. J., Maze, M. J., Galloway, R. L., Rubach, M. P., Biggs, H. M., Halliday, J. E. B., Cleaveland, S., Saganda, W., Lwezaula, B. F., Kazwala, R. R., Mmbaga, B. T., Maro, V. P. and Crump, J. A. (2020). "Molecular Detection and Typing of Pathogenic *Leptospira* in Febrile Patients and Phylogenetic Comparison with *Leptospira* Detected among Animals in Tanzania." Am J Trop Med Hyg **103**(4): 1427-1434; 10.4269/ajtmh.19-0703

Almeida, D. S., Paz, L. N., de Oliveira, D. S., Silva, D. N., Ristow, P., Hamond, C., Costa, F., Portela, R. W., Estrela-Lima, A. and Pinna, M. H. (2019). "Investigation of chronic infection by *Leptospira* spp. in asymptomatic sheep slaughtered in slaughterhouse." PLoS One **14**(5): e0217391

Amorena, B., Gracia, E., Monzon, M., Leiva, J., Oteiza, C., Perez, M., Alabart, J. L. and Hernandez-Yago, J. (1999). "Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro." J Antimicrob Chemother **44**(1): 43-55; 10.1093/jac/44.1.43

Anaissie, E., Samonis, G., Kontoyiannis, D., Costerton, J., Sabharwal, U., Bodey, G. and Raad, I. (1995). "Role of catheter colonization and infrequent hematogenous seeding in catheter-related infections." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **14**(2): 134-137; 10.1007/bf02111873

Anwar, H., Strap, J. L., Chen, K. and Costerton, J. W. (1992). "Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin." Antimicrob Agents Chemother **36**(6): 1208-1214; 10.1128/aac.36.6.1208

Aspe, M., Jensen, L., Melegrito, J. and Sun, M. (2012). "The role of alginate and extracellular DNA in biofilm-mediated *Pseudomonas aeruginosa* gentamicin resistance." J Exp Microbiol Immunol **16**: 42-48

Azizi, S., Kheirandish, R. and Rahimi, E. (2014). "Comparison of polymerase chain reaction and Warthin-Starry techniques to detect *Leptospira* spp. in kidneys of slaughtered cattle." Onderstepoort J Vet Res **81**(1): e1-e6; 10.4102/ojvr.v81i1.821

Baake, E. I., von Borstel, M., Rohn, K. and Ohnesorge, B. (2016). "Detection of intraocular leptospiral DNA, antibodies and *Leptospira* spp. in horses with equine recurrent uveitis in different laboratories." Pferdeheilkunde **32**(4): 346-356; 10.21836/PEM20160407

Babudieri, B. (1958). "Animal reservoirs of leptospires." Annals of the New York Academy of Sciences **70**(3): 393-413

Babudieri, B. (1961). "Laboratory diagnosis of leptospirosis." Bulletin of the World Health Organisation **24**(1): 45-58

Barbour, A. G. and Hayes, S. F. (1986). "Biology of *Borrelia* species." Microbiol Rev **50**(4): 381-400

Bartel, S. F. (2004). "Retrospektive kasuistische Analyse von 369 Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis (ERU)." Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Båverud, V., Gunnarsson, A., Engvall, E. O., Franzén, P. and Egenvall, A. (2009). "*Leptospira* seroprevalence and associations between seropositivity, clinical disease and host factors in horses." Acta Vet Scand **51**(1): 15; 10.1186/1751-0147-51-15

Bercovich, Z., Taaijke, R. and Bokhout, B. A. (1990). "Evaluation of an ELISA for the diagnosis of experimentally induced and naturally occurring *Leptospira hardjo* infections in cattle." Vet Microbiol **21**(3): 255-262; 10.1016/0378-1135(90)90036-u

Bernard, W. V. (1993). "Leptospirosis." Vet Clin North Am Equine Pract **9**(2): 435-444; 10.1016/s0749-0739(17)30410-8

Berndtson, K. (2013). "Review of evidence for immune evasion and persistent infection in Lyme disease." Int J Gen Med **6**: 291-306; 10.2147/ijgm.S44114

Bessemans, A., Wittebolle, P. and Baert, H. (1942). "Le micro-manipulateur et les granules d'une souche de Leptospire aquicole non-pathogene." Bull. ass. diploms microbiol. fac. pharm., Nancy **61**: 72-80

Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., Levett, P. N., Gilman, R. H., Willig, M. R., Gotuzzo, E. and Vinetz, J. M. (2003). "Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance." Lancet Infect Dis **3**(12): 757-771; 10.1016/s1473-3099(03)00830-2

Birch-Andersen, A., Hovind Hougen, K. and Borg-Petersen, C. (1973). "Electron microscopy of *Leptospira*. 1. *Leptospira* strain Pomona." Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol **81**(6): 665-676; 10.1111/j.1699-0463.1973.tb02258.x

Blenden, D. C. and Goldberg, H. S. (1965). "Silver Impregnation Stain for *Leptospira* and Flagella." J Bacteriol **89**(3): 899-900; 10.1128/jb.89.3.899-900.1965

Bodaghi, B. and LeHoang, P. (2002). "Testing ocular fluids in uveitis." Ophthalmol Clin North Am **15**(3): 271-279; 10.1016/s0896-1549(02)00037-8

Borstel, M., Oey, L., Strutzberg-Minder, K., Boevé, M. H. and Ohnesorge, B. (2010). "Direkter und indirekter Nachweis von Leptospiren aus Glaskörperproben von Pferden mit ERU." Pferdeheilkunde **2**: 219-225

Brandes, K. (2020). persönliche Mitteilung.

Brandes, K., Wollanke, B., Niedermaier, G., Brem, S. and Gerhards, H. (2007). "Recurrent uveitis in horses: vitreal examinations with ultrastructural detection of leptospire." J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med **54**(5): 270-275; 10.1111/j.1439-0442.2007.00921.x

Braunwald, E. (1997). Valvular heart disease In: Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 5th ed. R. O. Bonow, D. L. Mann and D. P. Zipes (Hrsg.), Saunders: 1035-1048.

Brem, S., Gerhards, H., Wollanke, B., Meyer, P. and Kopp, H. (1998). "[Demonstration of intraocular leptospira in 4 horses suffering from equine recurrent uveitis (ERU)]." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **111**(11-12): 415-417

Brem, S., Gerhards, H., Wollanke, B., Meyer, P. and Kopp, H. (1999). "[35 leptospira isolated from the vitreous body of 32 horses with recurrent uveitis (ERU)]." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **112**(10-11): 390-393

Brem, S. and Schönberg, A. (2009). Spirochäten. In: Mikrobiologische Diagnostik-Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie, 2nd ed. B. Neumeister, H. K. Geiss, R. W. Braun and P. Kimmig (Hrsg.), Thieme: 580-583.

Brihuega, B., Samartino, L., Auteri, C., Venzano, A. and Caimi, K. (2012). "In vivo cell aggregations of a recent swine biofilm-forming isolate of *Leptospira interrogans* strain from Argentina." Rev Argent Microbiol **44**(3): 138-143

Brorson, O. and Brorson, S. H. (1998). "In vitro conversion of *Borrelia burgdorferi* to cystic forms in spinal fluid, and transformation to mobile spirochetes by incubation in BSK-H medium." Infection **26**(3): 144-150; 10.1007/bf02771839

Brorson, O. and Brorson, S. H. (2004). "An in vitro study of the susceptibility of mobile and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to tinidazole." Int Microbiol **7**(2): 139-142



Brorson, Ø., Brorson, S. H., Scythes, J., MacAllister, J., Wier, A. and Margulis, L. (2009). "Destruction of spirochete *Borrelia burgdorferi* round-body propagules (RBs) by the antibiotic tigecycline." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(44): 18656-18661; 10.1073/pnas.0908236106

Burne, R. A., Chen, Y., Li, Y., Bhagwat, S., Wen, Z., Wilson, M. and Devine, D. (2003). Gene expression in oral biofilms. In: Medical Implications of Biofilms, 1st. ed. W. M. and D. Devine (Hrsg.), Cambridge University Press: 212-227.

Canale-Parola, E. (1978). "Motility and chemotaxis of spirochetes." Annu Rev Microbiol **32**: 69-99; 10.1146/annurev.mi.32.100178.000441

Caspi, R., Roberge, F., Chan, C., Wiggert, B., Chader, G., Rozenszajn, L., Lando, Z. and Nussenblatt, R. (1988). "A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens." The Journal of Immunology **140**(5): 1490-1495

Chapman, A. J., Adler, B. and Faine, S. (1988). "Antigens recognised by the human immune response to infection with *Leptospira interrogans* serovar hardjo." J Med Microbiol **25**(4): 269-278; 10.1099/00222615-25-4-269

Characklis, W. G. and Marshall, K. (1990). Biofilms. In: Biofilms, 5th ed. W. G. Characklis and K. Marshall (Hrsg.), Wiley-Interscience: 3-15.

Cheville, N. F., Huhn, R. and Cutlip, R. C. (1980). "Ultrastructure of renal lesions in pigs with acute leptospirosis caused by *Leptospira pomona*." Vet Pathol **17**(3): 338-351; 10.1177/030098588001700308

Chuard, C., Vaudaux, P., Waldvogel, F. A. and Lew, D. P. (1993). "Susceptibility of *Staphylococcus aureus* growing on fibronectin-coated surfaces to bactericidal antibiotics." Antimicrob Agents Chemother **37**(4): 625-632; 10.1128/aac.37.4.625

Cibulski, S. (2016). "Untersuchung von wildlebenden Kleinsäugetern und Wasserproben auf DNA pathogener Leptospiren mittels real-time PCR." Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Cibulski, S. and Wollanke, B. (2016). "Testing wild small mammals and water samples for pathogen leptospires using real-time PCR." Pferdeheilkunde **32**(6): 635-641

Cilia, G., Bertelloni, F., Coppola, F., Turchi, B., Biliotti, C., Poli, A., Parisi, F., Felicioli, A., Cerri, D. and Fratini, F. (2020). "Isolation of *Leptospira* serovar Pomona from a crested porcupine (*Hystrix cristata*, L., 1758)." Vet Med Sci **6**(4): 985-991; 10.1002/vms3.308

Coca-Prados, M. (2014). "The blood-aqueous barrier in health and disease." J Glaucoma **23**(8 Suppl 1): S36-38; 10.1097/ijg.0000000000000107

Coghlan, J. D. and Bain, A. (1969). "Leptospirosis in human pregnancy followed by death of the foetus." Br Med J **1**(5638): 228-230

Costerton, J. W. (1999). "Introduction to biofilm." Int J Antimicrob Agents **11**(3-4): 217-221; discussion 237-219; 10.1016/s0924-8579(99)00018-7

Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. and Marrie, T. J. (1987). "Bacterial biofilms in nature and disease." Annu Rev Microbiol **41**: 435-464; 10.1146/annurev.mi.41.100187.002251

Costerton, J. W., Geesey, G. G. and Cheng, K. J. (1978). "How bacteria stick." Sci Am **238**(1): 86-95; 10.1038/scientificamerican0178-86

Costerton, J. W. and Lappin-Scott, H. M. (1995). "Introduction to microbial biofilms." Microbial biofilms: 1-11

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. and Lappin-Scott, H. M. (1995). "Microbial biofilms." Annu Rev Microbiol **49**: 711-745; 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431

Costerton, J. W., Stewart, P. S. and Greenberg, E. P. (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." Science **284**(5418): 1318-1322; 10.1126/science.284.5418.1318

Cousins, D. V., Robertson, G. M. and Hustas, L. (1985). "The use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody response to *Leptospira interrogans* serovars hardjo, pomona and tarassovi in cattle." Vet Microbiol **10**(5): 439-450; 10.1016/0378-1135(85)90026-4

Cullen, P. A., Haake, D. A. and Adler, B. (2004). "Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes." FEMS Microbiol Rev **28**(3): 291-318; 10.1016/j.femsre.2003.10.004

Czekalowski, J. and Eaves, G. (1954). "Formation of granular structures by Leptospirae as revealed by the electron microscope." Journal of bacteriology **67**(6): 619

Dahme, E. and Weiss, E. (2007). Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. In: Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. E. Dahme and E. Weiss (Hrsg.), Enke. **6**.

Dart, J. K. G. (1996). Contact lens and prosthesis infections. In: Foundations of Ophthalmology, 1st ed. M. F. Marmor and D. M. Albert (Hrsg.), Lippincott-Raven: 1-30.

Davidson, M. G., Nasisse, M. P. and Roberts, S. M. (1987). "Immunodiagnosis of leptospiral uveitis in two horses." Equine Vet J **19**(2): 155-157; 10.1111/j.2042-3306.1987.tb02615.x

Davies, D. G. and Geesey, G. G. (1995). "Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture." Applied and environmental microbiology **61**(3): 860-867

Deeg, C. A. (2008). "Ocular immunology in equine recurrent uveitis." Vet Ophthalmol **11 Suppl 1**: 61-65; 10.1111/j.1463-5224.2008.00625.x

Deeg, C. A., Ehrenhofer, M., Thureau, S. R., Reese, S., Wildner, G. and Kaspers, B. (2002). "Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses." Exp Eye Res **75**(2): 127-133; 10.1006/exer.2002.2011

Deeg, C. A., Kaspers, B., Gerhards, H., Thureau, S. R., Wollanke, B. and Wildner, G. (2001). "Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(2): 393-398

Deeg, C. A., Marti, E., Gaillard, C. and Kaspers, B. (2004). "Equine recurrent uveitis is strongly associated with the MHC class I haplotype ELA-A9." Equine Vet J **36**(1): 73-75; 10.2746/0425164044864651

Deeg, C. A., Pompetzki, D., Raith, A. J., Hauck, S. M., Amann, B., Suppmann, S., Goebel, T. W., Olazabal, U., Gerhards, H., Reese, S., Stangassinger, M., Kaspers, B. and Ueffing, M. (2006). "Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis." Mol Cell Proteomics **5**(8): 1462-1470; 10.1074/mcp.M500352-MCP200

Deeg, C. A., Thureau, S. R., Gerhards, H., Ehrenhofer, M., Wildner, G. and Kaspers, B. (2002). "Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease." Eur J Immunol **32**(9): 2598-2606; 10.1002/1521-4141(200209)32:9<2598::Aid-immu2598>3.0.Co;2-#

DeLamater, E. D., Wiggall, R. H. and Haanes, M. (1950). "Studies on the life cycle of spirochetes; the life cycle of the Nichols pathogenic *Treponema pallidum* in the rabbit testis as seen by phase contrast microscopy." J Exp Med **92**(3): 239-246; 10.1084/jem.92.3.239

Desai, M., Buhler, T., Weller, P. H. and Brown, M. R. (1998). "Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth." J Antimicrob Chemother **42**(2): 153-160; 10.1093/jac/42.2.153

Divers, T. J., Chang, Y. F., Irby, N. L., Smith, J. L. and Carter, C. N. (2019). "Leptospirosis: An important infectious disease in North American horses." Equine Vet J **51**(3): 287-292; 10.1111/evj.13069

Donlan, R. M. and Costerton, J. W. (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." Clin Microbiol Rev **15**(2): 167-193; 10.1128/cmr.15.2.167-193.2002

Douglas, J. (1992). "Prosthetic valve endocarditis." Infective endocarditis: 375-396

Duguid, I. G., Evans, E., Brown, M. R. and Gilbert, P. (1992). "Effect of biofilm culture upon the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin." J Antimicrob Chemother **30**(6): 803-810; 10.1093/jac/30.6.803

Dumler, J. S. (2001). "Molecular diagnosis of Lyme disease: review and meta-analysis." Mol Diagn **6**(1): 1-11; 10.1054/modi.2001.21898

Dwyer, A. E., Crockett, R. S. and Kalsow, C. M. (1995). "Association of leptospiral seroreactivity and breed with uveitis and blindness in horses: 372 cases (1986-1993)." J Am Vet Med Assoc **207**(10): 1327-1331

Ebani, V. V., Bertelloni, F., Pinzauti, P. and Cerri, D. (2012). "Seroprevalence of *Leptospira* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Italian horses." Ann Agric Environ Med **19**(2): 237-240

Elliott, T. S., Moss, H. A., Tebbs, S. E., Wilson, I. C., Bonser, R. S., Graham, T. R., Burke, L. P. and Faroqui, M. H. (1997). "Novel approach to investigate a source of microbial contamination of central venous catheters." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **16**(3): 210-213; 10.1007/bf01709583

Ellis, W. A., McParland, P. J., Bryson, D. G., Thiermann, A. B. and Montgomery, J. (1986). "Isolation of leptospire from the genital tract and kidneys of aborted sows." Vet Rec **118**(11): 294-295; 10.1136/vr.118.11.294

Evans, D. J., Allison, D. G., Brown, M. R. and Gilbert, P. (1990). "Effect of growth-rate on resistance of gram-negative biofilms to cetrimide." J Antimicrob Chemother **26**(4): 473-478; 10.1093/jac/26.4.473

- Faber, N. A., Crawford, M., LeFebvre, R. B., Buyukmihci, N. C., Madigan, J. E. and Willits, N. H. (2000). "Detection of *Leptospira* spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis." Journal of Clinical Microbiology **38**(7): 2731-2733
- Faine, S., Adler, B., Bolin, C. and Perolat, P. (2000). *Leptospira* and leptospirosis. Australia: MediSci. **2**.
- Faine, S., Adler, B., Christopher, W. and Valentine, R. (1984). "Fatal congenital human leptospirosis." Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology **257**(4): 548
- Fantham, H. (1916). "Spirochaetes and their granule phase." British medical journal **1**(2881): 409
- Farr, R. W. (1995). "Leptospirosis." Clin Infect Dis **21**(1): 1-6; quiz 7-8; 10.1093/clinids/21.1.1
- Faulkner, R. and Lilue, R. (1945). "A buffer modification of the Warthin-Starry silver method for spirochaetes in single paraffin sections." Stain Technology **20**(3): 81-82
- Fischer, B. M., McMullen, R. J., Jr., Reese, S. and Brehm, W. (2019). "Intravitreal injection of low-dose gentamicin for the treatment of recurrent or persistent uveitis in horses: Preliminary results." BMC Vet Res **15**(1): 29; 10.1186/s12917-018-1722-7
- Flemming, H. C. and Wingender, J. (2010). "The biofilm matrix." Nat Rev Microbiol **8**(9): 623-633; 10.1038/nrmicro2415
- Frühauf, B., Ohnesorge, B., Deegen, E. and Boeve, M. (1998). "Surgical management of equine recurrent uveitis with single port pars plana vitrectomy." Vet Ophthalmol **1**(2-3): 137-151; 10.1046/j.1463-5224.1998.00030.x



Geiger, T. X. (2019). "Evaluierung des SNAP-Lepto®(ELISA-Schnelltest) für den Nachweis von Antikörpern gegen LipL32 in Serum und intraokularem Probenmaterial von Pferden als Diagnostikum der Leptospireninduzierten equinen rezidivierenden Uveitis (ERU)." Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Geißler, P. K. (2021). "Biofilm-Bildung als Pathogenitätsmechanismus bei persistierenden Infektionen und ihre mögliche Rolle bei der Equinen Rezidivierenden Uveitis." Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Gerhards, H. and Wollanke, B. (2001). "Uveitis bei Pferden-Diagnose und Therapie." Pferdeheilkunde **17**(4): 319-329

Gerhards, H. and Wollanke, B. (2005). Surgical treatment of equine recurrent uveitis: Transpars-plana vitrectomy in horses. In: Equine Ophthalmology, 1st ed. B. C. Gilger (Hrsg.), Elsevier Saunders: 314-319.

Gerhards, H. and Wollanke, B. (2006). Equine rezidivierende Uveitis. In: Handbuch Pferdepraxis, 3rd ed. O. Dietz and B. Huskamp (Hrsg.), Enke Verlag: 775-786.

Gerhards, H., Wollanke, B. and Brem, S. (1999). "Vitrectomy as a diagnostic and therapeutic approach for equine recurrent uveitis (ERU)." Proceedings 45th Ann. Conv. AAEP, Albuquerque **45**: 89-93

Gerhards, H., Wollanke, B., Winterberg, A. and Werry, H. (1998). Technique for and results with surgical treatment of equine recurrent uveitis (ERU). Proceedings of the 29th Annual Meeting of the American College of Veterinary Ophthalmologists, Seattle.

Gery, I., Wiggert, B., Redmond, T. M., Kuwabara, T., Crawford, M. A., Vistica, B. P. and Chader, G. J. (1986). "Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein." Invest Ophthalmol Vis Sci **27**(8): 1296-1300

Gesell, S. (2004). "Gibt es eine asymptomatische intraokulare Leptospireninfektion beim Pferd?" Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Gilger, B. C. (2016). "Recurrent uveitis." Equine Clinical Immunology: 121-126

Gilger, B. C. and Deeg, C. (2011). Equine recurrent uveitis. In: Equine ophthalmology, 2nd ed. B. C. Gilger (Hrsg.), Elsevier Saunders: 317-349.

Gilger, B. C., Malok, E., Cutter, K. V., Stewart, T., Horohov, D. W. and Allen, J. B. (1999). "Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis." Vet Immunol Immunopathol **71**(1): 17-28; 10.1016/s0165-2427(99)00082-3

Gilger, B. C. and Michau, T. M. (2004). "Equine recurrent uveitis: new methods of management." The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice **20**(2): 417-427

Gilger, B. C., Salmon, J. H., Wilkie, D. A., Cruysberg, L. P., Kim, J., Hayat, M., Kim, H., Kim, S., Yuan, P. and Lee, S. S. (2006). "A novel bioerodible deep scleral lamellar cyclosporine implant for uveitis." Investigative ophthalmology & visual science **47**(6): 2596-2605

Gilger, B. C., Salmon, J. H., Yi, N. Y., Barden, C. A., Chandler, H. L., Wendt, J. A. and Colitz, C. M. (2008). "Role of bacteria in the pathogenesis of recurrent uveitis in horses from the southeastern United States." Am J Vet Res **69**(10): 1329-1335; 10.2460/ajvr.69.10.1329

Goldstein, S. F. and Charon, N. W. (1988). "Motility of the spirochete *Leptospira*." Cell Motil Cytoskeleton **9**(2): 101-110; 10.1002/cm.970090202

Govan, J. R. and Deretic, V. (1996). "Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*." Microbiol Rev **60**(3): 539-574

Grisanti, S. (1998). "[Immune privilege of the eye]." Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft **95**(2): 124-135; 10.1007/s003470050250

Grooms, D. L. (2006). "Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis." Theriogenology **66**(3): 624-628; 10.1016/j.theriogenology.2006.04.016

- Gruntar, I., Malovrh, T., Murgia, R. and Cinco, M. (2001). "Conversion of *Borrelia garinii* cystic forms to motile spirochetes in vivo." Apmis **109**(5): 383-388; 10.1034/j.1600-0463.2001.090507.x
- Gsell, O., Rehsteiner, K. and Verrey, F. (1946). "Iridocyclitis als Spätfolge von Leptospirosis." Ophthalmologica **112**(6): 320-334; 10.1159/000300399
- Haake, D. A. (2000). "Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis." Microbiology **146**(Pt 7): 1491-1504; 10.1099/00221287-146-7-1491
- Hall-Stoodley, L. and Stoodley, P. (2009). "Evolving concepts in biofilm infections." Cell Microbiol **11**(7): 1034-1043; 10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., Kathju, S., Høiby, N., Moser, C., Costerton, J. W., Moter, A. and Bjarnsholt, T. (2012). "Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections." FEMS Immunol Med Microbiol **65**(2): 127-145; 10.1111/j.1574-695X.2012.00968.x
- Halliwell, R. E., Brim, T. A., Mines, M. T., Wolf, D. and White, F. H. (1985). "Studies on equine recurrent uveitis. II: The role of infection with *Leptospira interrogans* serovar pomona." Current eye research **4**(10): 1033-1040
- Hamond, C., Martins, G., Lawson-Ferreira, R., Medeiros, M. A. and Lilenbaum, W. (2013). "The role of horses in the transmission of leptospirosis in an urban tropical area." Epidemiol Infect **141**(1): 33-35; 10.1017/s0950268812000416
- Hamond, C., Martins, G. and Lilenbaum, W. (2012). "Pulmonary hemorrhage in horses seroreactive to leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil." J Vet Intern Med **26**(6): 1237-1238; 10.1111/j.1939-1676.2012.01020.x
- Hampp, E. G. (1951). "Further studies on the significance of spirochetal granules." J Bacteriol **62**(3): 347-349; 10.1128/jb.62.3.347-349.1951
- Hancock, E. (1994). "Artificial valve disease." The heart arteries and veins **2**: 1539-1545

Hanno, H. A. and Cleveland, A. F. (1949). "Leptospiral uveitis." Am J Ophthalmol **32**(11): 1564-1566; 10.1016/s0002-9394(49)90377-3

Hanson, L. E. (1982). "Leptospirosis in domestic animals: the public health perspective." J Am Vet Med Assoc **181**(12): 1505-1509

Hartskeerl, R. A., Goris, M. G., Brem, S., Meyer, P., Kopp, H., Gerhards, H. and Wollanke, B. (2004). "Classification of leptospira from the eyes of horses suffering from recurrent uveitis." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **51**(3): 110-115; 10.1111/j.1439-0450.2004.00740.x

Hartwigk, H. and Stoebbe, E. (1952). "Kultureller Nachweis von Leptospiren bei Hund und Pferd." Berl Münch Tierärztl Wschr **65**(9): 188-190

Heusser, H. (1948). "Die periodische Augenentzündung, eine Leptospirose." Schweiz. Arch. Tierheilk **90**: 287-314

Heusser, H. (1952). "Zur Ätiologie der periodischen Augenentzündung." Schweiz. Arch. Tierheilk **94**: 296-306

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. and Ciofu, O. (2010). "Antibiotic resistance of bacterial biofilms." Int J Antimicrob Agents **35**(4): 322-332; 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Bassi, G. L., Coenye, T., Donelli, G., Hall-Stoodley, L., Holá, V., Imbert, C., Kirketerp-Møller, K., Lebeaux, D., Oliver, A., Ullmann, A. J. and Williams, C. (2015). "ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014." Clin Microbiol Infect **21 Suppl 1**: 1-25; 10.1016/j.cmi.2014.10.024

Høiby, N., Ciofu, O. and Bjarnsholt, T. (2010). "*Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis." Future Microbiol **5**(11): 1663-1674; 10.2217/fmb.10.125

- Houwens, D. J., Goris, M. G., Abdoel, T., Kas, J. A., Knobbe, S. S., van Dongen, A. M., Westerduin, F. E., Klein, W. R. and Hartskeerl, R. A. (2011). "Agglutinating antibodies against pathogenic *Leptospira* in healthy dogs and horses indicate common exposure and regular occurrence of subclinical infections." Vet Microbiol **148**(2-4): 449-451; 10.1016/j.vetmic.2010.08.020
- Hovind-Hougen, K. (1981). "Morphologie des leptospires." Médecine et Maladies Infectieuses **11**(2): 60-70
- Hoyle, B. D. and Costerton, J. W. (1991). "Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms." Prog Drug Res **37**: 91-105; 10.1007/978-3-0348-7139-6\_2
- Hoyle, B. D., Wong, C. K. and Costerton, J. W. (1992). "Disparate efficacy of tobramycin on Ca(2+)-, Mg(2+)-, and HEPES-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Can J Microbiol **38**(11): 1214-1218; 10.1139/m92-201
- Iglezias, S. D., Abreu, P. A. E., Kanamura, C., Magaldi, A. J., Seguro, A. C. and Brito, T. (2020). "Immunohistochemical detection of Lp25 and LipL32 proteins in skeletal and cardiac muscles of fatal human leptospirosis." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **62**: 85; 10.1590/s1678-9946202062085
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M. and Kamil, M. A. (2018). "Bacterial biofilm and associated infections." J Chin Med Assoc **81**(1): 7-11; 10.1016/j.jcma.2017.07.012
- Jefferson, K. K. (2004). "What drives bacteria to produce a biofilm?" FEMS Microbiol Lett **236**(2): 163-173; 10.1016/j.femsle.2004.06.005
- Jensen, E. T., Kharazmi, A., Høiby, N. and Costerton, J. W. (1992). "Some bacterial parameters influencing the neutrophil oxidative burst response to *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Apmis **100**(8): 727-733

- Jensen, E. T., Kharazmi, A., Lam, K., Costerton, J. W. and Høiby, N. (1990). "Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas aeruginosa* grown in biofilms." Infect Immun **58**(7): 2383-2385; 10.1128/iai.58.7.2383-2385.1990
- Jiang, L. Q. and Streilein, J. (1991). "Immune privilege extended to allogeneic tumor cells in the vitreous cavity." Investigative ophthalmology & visual science **32**(1): 224-228
- Jiang, L. Q., Streilein, J. W. and McKinney, C. (1994). "Immune privilege in the eye: an evolutionary adaptation." Developmental & Comparative Immunology **18**(5): 421-431
- Joo, H. S. and Otto, M. (2012). "Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens." Chem Biol **19**(12): 1503-1513; 10.1016/j.chembiol.2012.10.022
- Jung, B. Y., Lee, K. W. and Ha, T. Y. (2010). "Seroprevalence of *Leptospira* spp. in clinically healthy racing horses in Korea." J Vet Med Sci **72**(2): 197-201; 10.1292/jvms.09-0273
- Kayser, F. H., Böttger, E. C., Zinkernagel, R. M., Haller, O., Eckert, J. and Deplazes, P. (2010). Leptospira (Leptospirose, Morbus Weil). Stuttgart: Georg Thieme Verlag. **12**: 344-347.
- Keller, R. L. and Hendrix, D. V. (2005). "New surgical therapies for the treatment of equine recurrent uveitis." Clinical Techniques in Equine Practice **4**(1): 81-86
- Kersten, A., Poitschek, C., Rauch, S. and Aberer, E. (1995). "Effects of penicillin, ceftriaxone, and doxycycline on morphology of *Borrelia burgdorferi*." Antimicrob Agents Chemother **39**(5): 1127-1133; 10.1128/aac.39.5.1127
- Klempner, M. S., Baker, P. J., Shapiro, E. D., Marques, A., Dattwyler, R. J., Halperin, J. J. and Wormser, G. P. (2013). "Treatment trials for post-Lyme disease symptoms revisited." Am J Med **126**(8): 665-669; 10.1016/j.amjmed.2013.02.014
- Ko, A. I., Galvão Reis, M., Ribeiro Dourado, C. M., Johnson, W. D., Jr. and Riley, L. W. (1999). "Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group." Lancet **354**(9181): 820-825; 10.1016/s0140-6736(99)80012-9



Koch, C. and Høiby, N. (1993). "Pathogenesis of cystic fibrosis." Lancet **341**(8852): 1065-1069; 10.1016/0140-6736(93)92422-p

Kodjikian, L., Burillon, C., Lina, G., Roques, C., Pellon, G., Freney, J. and Renaud, F. N. (2003). "Biofilm formation on intraocular lenses by a clinical strain encoding the ica locus: a scanning electron microscopy study." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(10): 4382-4387; 10.1167/iovs.03-0185

Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., Blehert, D. S., Egland, P. G., Foster, J. S. and Palmer, R. J., Jr. (2002). "Communication among oral bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **66**(3): 486-505, table of contents; 10.1128/mmbr.66.3.486-505.2002

Kolenbrander, P. E. and London, J. (1993). "Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence." J Bacteriol **175**(11): 3247-3252; 10.1128/jb.175.11.3247-3252.1993

Kosiewicz, M. M., Okamoto, S., Miki, S., Ksander, B. R., Shimizu, T. and Streilein, J. W. (1994). "Imposing deviant immunity on the presensitized state." The Journal of Immunology **153**(7): 2962-2973

Krauss, H. (2004). Zoonosen: von Tier zu Mensch übertragbare Infektionskrankheiten. Deutscher Ärzteverlag. **3**: 251-253.

Ksander, B. R., Acevedo, J. and Streilein, J. (1992). "Local T helper cell signals by lymphocytes infiltrating intraocular tumors." The Journal of Immunology **148**(6): 1955-1963

Kuchma, S. L. and O'Toole, G. A. (2000). "Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression." Curr Opin Biotechnol **11**(5): 429-433; 10.1016/s0958-1669(00)00123-3

Kulbrock, M., von Borstel, M., Rohn, K., Distl, O. and Ohnesorge, B. (2013). "Occurrence and severity of equine recurrent uveitis in warmblood horses-A comparative study." Pferdeheilkunde **29**(1): 27-36

- Kurtti, T. J., Munderloh, U. G., Johnson, R. C. and Ahlstrand, G. G. (1987). "Colony formation and morphology in *Borrelia burgdorferi*." J Clin Microbiol **25**(11): 2054-2058; 10.1128/jcm.25.11.2054-2058.1987
- Lam, J., Chan, R., Lam, K. and Costerton, J. W. (1980). "Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis." Infect Immun **28**(2): 546-556
- Lamont, R. J. and Jenkinson, H. F. (1998). "Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*." Microbiol Mol Biol Rev **62**(4): 1244-1263
- Lavach, J. D. (1990). Large animal ophthalmology, Mosby St. Louis: 240.
- Levett, P. N. (2001). "Leptospirosis." Clin Microbiol Rev **14**(2): 296-326; 10.1128/cmr.14.2.296-326.2001
- Lewis, K. (2001). "Riddle of biofilm resistance." Antimicrob Agents Chemother **45**(4): 999-1007; 10.1128/aac.45.4.999-1007.2001
- Liegner, K. B., Shapiro, J. R., Ramsay, D., Halperin, A. J., Hogrefe, W. and Kong, L. (1993). "Recurrent erythema migrans despite extended antibiotic treatment with minocycline in a patient with persisting *Borrelia burgdorferi* infection." J Am Acad Dermatol **28**(2 Pt 2): 312-314; 10.1016/0190-9622(93)70043-s
- Loibl, J. (2009). "Immunologische und mikrobiologische Untersuchungen zur intraokular persistierenden Leptospireninfektion bei Pferden mit rezidivierender Uveitis." Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Loibl, J., Gerhards, H., Brem, S. and Wollanke, B. (2018). "Improving the laboratory diagnosis of leptospiral uveitis in horses by using an indirect ELISA for the detection of antibodies against *Leptospira* spp. in intraocular samples." Pferdeheilkunde **34**: 267-277

- MacDonald, A. B. (2006). "Spirochetal cyst forms in neurodegenerative disorders,...hiding in plain sight." Med Hypotheses **67**(4): 819-832; 10.1016/j.mehy.2006.04.025
- Maki, D. (1994). "Infections caused by intravascular devices used for infusion therapy: pathogenesis, prevention, and management." Infections associated with indwelling medical devices **2**: 155-212
- Malalana, F., Blundell, R. J., Pinchbeck, G. L. and McGowan, C. M. (2017). "The role of *Leptospira* spp. in horses affected with recurrent uveitis in the UK." Equine Vet J **49**(6): 706-709; 10.1111/evj.12683
- Malalana, F., Stylianides, A. and McGowan, C. (2015). "Equine recurrent uveitis: Human and equine perspectives." Vet J **206**(1): 22-29; 10.1016/j.tvjl.2015.06.017
- Marsh, P. D. and Bradshaw, D. J. (1995). "Dental plaque as a biofilm." J Ind Microbiol **15**(3): 169-175; 10.1007/bf01569822
- Marshall, K. C. (1976). Interfaces in microbial ecology. Harvard University Press.
- Mathee, K., Ciofu, O., Sternberg, C., Lindum, P. W., Campbell, J. I. A., Jensen, P., Johnsen, A. H., Givskov, M., Ohman, D. E., Søren, M., Højby, N. and Kharazmi, A. (1999). "Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung." Microbiology **145** ( Pt 6): 1349-1357; 10.1099/13500872-145-6-1349
- Matthews, A. G., Waitkins, S. A. and Palmer, M. F. (1987). "Serological study of leptospiral infections and endogenous uveitis among horses and ponies in the United Kingdom." Equine Vet J **19**(2): 125-128; 10.1111/j.2042-3306.1987.tb02605.x
- May, T. B., Shinabarger, D., Maharaj, R., Kato, J., Chu, L., DeVault, J. D., Roychoudhury, S., Zielinski, N. A., Berry, A., Rothmel, R. K. and et al. (1991). "Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients." Clin Microbiol Rev **4**(2): 191-206; 10.1128/cmr.4.2.191

- McLaughlin-Borlace, L., Stapleton, F., Matheson, M. and Dart, J. K. (1998). "Bacterial biofilm on contact lenses and lens storage cases in wearers with microbial keratitis." J Appl Microbiol **84**(5): 827-838; 10.1046/j.1365-2672.1998.00418.x
- Meluleni, G. J., Grout, M., Evans, D. J. and Pier, G. B. (1995). "Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoid exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients." J Immunol **155**(4): 2029-2038
- Miklossy, J., Kasas, S., Zurn, A. D., McCall, S., Yu, S. and McGeer, P. L. (2008). "Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis." J Neuroinflammation **5**: 40; 10.1186/1742-2094-5-40
- Miller, M. J. and Ahearn, D. G. (1987). "Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrophilic contact lenses and other substrata." J Clin Microbiol **25**(8): 1392-1397; 10.1128/jcm.25.8.1392-1397.1987
- Miller, N. G. and Wilson, R. B. (1962). "In Vivo and In Vitro Observations of *Leptospira Pomona* by Electron Microscopy." J Bacteriol **84**(3): 569-576; 10.1128/jb.84.3.569-576.1962
- Morter, R. L., Herschler, R. C., Fessler, J. F. and Lavignette, A. (1964). "Experimental equine leptospirosis (*Leptospira pomona*)." Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc **68**: 147-152
- Morter, R. L., Williams, R. D., Bolte, H. and Freeman, M. J. (1969). "Equine leptospirosis." J Am Vet Med Assoc **155**(2): 436-442
- Murgia, R. and Cinco, M. (2004). "Induction of cystic forms by different stress conditions in *Borrelia burgdorferi*." Apmis **112**(1): 57-62; 10.1111/j.1600-0463.2004.apm1120110.x
- Murray, G. L. (2015). "The molecular basis of leptospiral pathogenesis." Curr Top Microbiol Immunol **387**: 139-185; 10.1007/978-3-662-45059-8\_7

- Mursic, V. P., Wanner, G., Reinhardt, S., Wilske, B., Busch, U. and Marget, W. (1996). "Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast-L-form variants." Infection **24**(3): 218-226; 10.1007/bf01781096
- Niedermaier, G. (2002). "Elektronenmikroskopische Untersuchung des Glaskörpers des Pferdes mit equiner rezidivierender Uveitis." Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Niedermaier, G., Wollanke, B., Hoffmann, R., Brem, S. and Gerhards, H. (2006). "Detection of leptospira in the vitreous body of horses without ocular diseases and of horses with equine recurrent uveitis (ERU) using transmission-electron microscopy." DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift **113**(11): 418-422
- O'Toole, G., Kaplan, H. B. and Kolter, R. (2000). "Biofilm formation as microbial development." Annu Rev Microbiol **54**: 49-79; 10.1146/annurev.micro.54.1.49
- OIE (2021). "*Leptospira interrogans* ssp." OIE, World Organization for Animal Health. from <https://www.oie.int/app/uploads/2021/05/leptospira-interrogans-ssp-infection-with.pdf>.
- Palmer, M. F. (1988). "Laboratory diagnosis of leptospirosis." Med Lab Sci **45**(2): 174-178
- Parsek, M. R. and Singh, P. K. (2003). "Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis." Annu Rev Microbiol **57**: 677-701; 10.1146/annurev.micro.57.030502.090720
- Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J. and Hook, M. (1994). "MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues." Annu Rev Microbiol **48**: 585-617; 10.1146/annurev.mi.48.100194.003101
- Percival, S. L., Malic, S., Cruz, H. and Williams, D. W. (2011). Introduction to biofilms. In: Biofilms and veterinary medicine. S. L. Percival, D. C. Knottenbelt and C. A. Cochrane (Hrsg.), Springer: 41-68.

Popp, M., Gerhards, H. and Wollanke, B. (2013). "Enrofloxacin concentrations in the vitreous of horses with equine recurrent uveitis (ERU) after repeated intravenous administration." Pferdeheilkunde **29**(5): 574-580

Quinn, P. J. (1994). Clinical veterinary microbiology. Wiley Blackwell.

Raad, I. (1998). "Intravascular-catheter-related infections." Lancet **351**(9106): 893-898; 10.1016/s0140-6736(97)10006-x

Raad, I., Costerton, W., Sabharwal, U., Sadlowski, M., Anaissie, E. and Bodey, G. P. (1993). "Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement." Journal of Infectious Diseases **168**(2): 400-407

Rathinam, S. R. and Namperumalsamy (2009). "Leptospirosis." Ocular Immunology and Inflammation **7**(2): 109-118

Rebhun, W. C. (1979). "Diagnosis and treatment of equine uveitis." J Am Vet Med Assoc **175**(8): 803-808

Reis, F. J. and Damaceno, N. (1998). "[Cystic fibrosis]." J Pediatr (Rio J) **74** Suppl 1: 76-94; 10.2223/jped.489

Rettinger, A., Krupka, I., Grünwald, K., Dyachenko, V., Fingerle, V., Konrad, R., Raschel, H., Busch, U., Sing, A., Straubinger, R. K. and Huber, I. (2012). "*Leptospira* spp. strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST)." BMC Microbiol **12**: 185; 10.1186/1471-2180-12-185

Riedelsheimer, B. and Büchl-Zimmermann, S. (2015). Romeis Mikroskopische Technik. In: Romeis Mikroskopische Technik, 19th ed. M. Mulisch and U. Welsch (Hrsg.), Springer Spektrum: 234-235.



Rimpau, W. (1947). "Leptospirose beim Pferd (Periodische Augenentzündung)." Tierärztl Umschau **2**: 177-178

Ristow, P., Bourhy, P., Kerneis, S., Schmitt, C., Prevost, M. C., Lilenbaum, W. and Picardeau, M. (2008). "Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires." Microbiology **154**(Pt 5): 1309-1317; 10.1099/mic.0.2007/014746-0

Ritchie, A. E. and Ellinghausen, H. C. (1965). "Electron Microscopy of Leptospire. I. Anatomical Features of *Leptospira Pomona*." J Bacteriol **89**(1): 223-233; 10.1128/jb.89.1.223-233.1965

RKI (2015). "RKI-Ratgeber Leptospirose." Robert Koch-Institut. from [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Leptospirose.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Leptospirose.html).

Roberts, S. J. (1969). "Comments on equine leptospirosis." J Am Vet Med Assoc **155**(2): 442-445

Roberts, S. J., York, C. J. and Robinson, J. W. (1952). "An outbreak of leptospirosis in horses on a small farm." J Am Vet Med Assoc **121**(907): 237-242

Roczek, A. (2008). "Entwicklung einer quantitativen PCR zum Nachweis von DNA pathogener Leptospiren in Glaskörper- und Kammerwasserproben von Pferden." Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Saglam, Y., Yener, Z., Temur, A. and Yalcin, E. (2008). "Immunohistochemical detection of leptospiral antigens in cases of naturally occurring abortions in sheep." Small Ruminant Research **74**(1-3): 119-122

Santos, A. A., Figueira, C. P., dos Reis, M. G., Costa, F. and Ristow, P. (2015). "Heterogenic colonization patterns by *Leptospira interrogans* in *Rattus norvegicus* from urban slums." Braz J Microbiol **46**(4): 1161-1164; 10.1590/s1517-838246420140873

Sapi, E., Balasubramanian, K., Poruri, A., Maghsoudlou, J. S., Socarras, K., Timmaraju, A., Filush, K., Gupta, K., Shaikh, S. and Theophilus, P. A. (2016). "Evidence of in vivo existence of *Borrelia* biofilm in borrelial lymphocytomas." European Journal of Microbiology and Immunology **6**(1): 9-24

Sapi, E., Bastian, S. L., Mpoy, C. M., Scott, S., Rattelle, A., Pabbati, N., Poruri, A., Burugu, D., Theophilus, P. A., Pham, T. V., Datar, A., Dhaliwal, N. K., MacDonald, A., Rossi, M. J., Sinha, S. K. and Luecke, D. F. (2012). "Characterization of biofilm formation by *Borrelia burgdorferi* in vitro." PLoS One **7**(10): e48277; 10.1371/journal.pone.0048277

Sapi, E., Kaur, N., Anyanwu, S., Luecke, D. F., Datar, A., Patel, S., Rossi, M. and Stricker, R. B. (2011). "Evaluation of in-vitro antibiotic susceptibility of different morphological forms of *Borrelia burgdorferi*." Infect Drug Resist **4**: 97-113; 10.2147/idr.S19201

Schafbauer, T., Dreyfus, A., Hogan, B., Rakotozandrindrainy, R., Poppert, S. and Straubinger, R. K. (2019). "Seroprevalence of *Leptospira* spp. Infection in Cattle from Central and Northern Madagascar." Int J Environ Res Public Health **16**(11); 10.3390/ijerph16112014

Schinagl, C. (2017). "Pars-Plana-Vitrektomie bei Equiner Rezidivierender Uveitis." Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Schönberg, A. (1984). "Diagnostik bei Leptospirosen." Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology **258**(4): 480-491

Schulz, L.-C. and W., H. (1989). Zur Bedeutung der Grenzflächengewebe bei der rheumatoiden Entzündung. In: Pathomechanismen entzündlicher rheumatischer Erkrankungen bei Mensch und Tier. H. Deicher (Hrsg.), DFG, Sonderforschungsbereiche: 327-341.

Schwink, K. L. (1992). "Equine uveitis." Vet Clin North Am Equine Pract **8**(3): 557-574; 10.1016/s0749-0739(17)30441-8

Selbitz, H. J. (2007). Bakterielle Krankheiten der Tiere In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7th ed. H. J. Selbitz (Hrsg.), Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart: 417-418; 423-427.

Shapiro, J. A. (1998). "Thinking about bacterial populations as multicellular organisms." Annu Rev Microbiol **52**: 81-104; 10.1146/annurev.micro.52.1.81

Shiau, A. L. and Wu, C. L. (1998). "The inhibitory effect of *Staphylococcus epidermidis* slime on the phagocytosis of murine peritoneal macrophages is interferon-independent." Microbiol Immunol **42**(1): 33-40; 10.1111/j.1348-0421.1998.tb01966.x

Sillerud, C. L., Bey, R. F., Ball, M. and Bistner, S. I. (1987). "Serologic correlation of suspected *Leptospira interrogans* serovar pomona-induced uveitis in a group of horses." J Am Vet Med Assoc **191**(12): 1576-1578

Singh, R., Stine, O. C., Smith, D. L., Spitznagel, J. K., Jr., Labib, M. E. and Williams, H. N. (2003). "Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems." Appl Environ Microbiol **69**(6): 3412-3420; 10.1128/aem.69.6.3412-3420.2003

Skilbeck, N. W. and Chappel, R. J. (1987). "Immunogold silver staining for visualization of leptospires in histologic sections." J Clin Microbiol **25**(1): 85-86; 10.1128/jcm.25.1.85-86.1987

Slots, J. and Genco, R. J. (1984). "Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction." J Dent Res **63**(3): 412-421; 10.1177/00220345840630031101

Songer, J. G. and Thiermann, A. B. (1988). "Leptospirosis." J Am Vet Med Assoc **193**(10): 1250-1254

- Sonoda, K. H., Sakamoto, T., Qiao, H., Hisatomi, T., Oshima, T., Tsutsumi-Miyahara, C., Exley, M., Balk, S. P., Taniguchi, M. and Ishibashi, T. (2005). "The analysis of systemic tolerance elicited by antigen inoculation into the vitreous cavity: vitreous cavity-associated immune deviation." Immunology **116**(3): 390-399
- Spiess, B. (1997). "Zur equinen rezidivierenden Uveitis (ERU)." Schweiz. Arch. Tierheilk **139**: 126-133
- Spiess, B. (2010). "Equine recurrent uveitis: the European viewpoint." Equine veterinary journal **42**(S37): 50-56
- Spiess, B. M. (1997). "[Equine recurrent uveitis]." Schweiz Arch Tierheilkd **139**(3): 126-133
- Srivastava, S. Y. and de Silva, A. M. (2009). "Characterization of *Borrelia burgdorferi* aggregates." Vector Borne Zoonotic Dis **9**(3): 323-329; 10.1089/vbz.2008.0148
- Stapleton, F. and Dart, J. (1995). "*Pseudomonas* keratitis associated with biofilm formation on a disposable soft contact lens." Br J Ophthalmol **79**(9): 864-865; 10.1136/bjo.79.9.864
- Stapleton, F., Dart, J. K., Matheson, M. and Woodward, E. G. (1993). "Bacterial adherence and glycocalyx formation on unworn hydrogel lenses." Journal of the British Contact Lens Association **16**(3): 113-117
- Steere, A. C. and Angelis, S. M. (2006). "Therapy for Lyme arthritis: strategies for the treatment of antibiotic-refractory arthritis." Arthritis Rheum **54**(10): 3079-3086; 10.1002/art.22131
- Straubinger, R. K. (2015). Spirochaeten. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. H.-J. Selbitz, U. Truyen and P. Valentin-Weigand (Hrsg.), Ferdinand Enke Verlag. **10**: 140-146.
- Suci, P. A., Mittelman, M. W., Yu, F. P. and Geesey, G. G. (1994). "Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Antimicrob Agents Chemother **38**(9): 2125-2133; 10.1128/aac.38.9.2125

Szemes, P. A. (1999). "Untersuchungen zur Prävalenz der equinen rezidivierenden Uveitis im Grossraum Köln-Bonn." Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Thiermann, A. B. (1984). "Leptospirosis: current developments and trends." J Am Vet Med Assoc **184**(6): 722-725

Timmaraju, V. A., Theophilus, P. A., Balasubramanian, K., Shakih, S., Luecke, D. F. and Sapi, E. (2015). "Biofilm formation by *Borrelia burgdorferi* sensu lato." FEMS Microbiol Lett **362**(15): fnv120; 10.1093/femsle/fnv120

Tsuchimoto, M., Niikura, M., Ono, E., Kida, H. and Yanagawa, R. (1984). "Leptospiral attachment to cultured cells." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A **258**(2-3): 268-274; 10.1016/s0176-6724(84)80044-9

Varni, V., Chiani, Y., Nagel, A., Ruybal, P., Vanasco, N. B. and Caimi, K. (2018). "Simplified MLST scheme for direct typing of *Leptospira* human clinical samples." Pathog Glob Health **112**(4): 203-209; 10.1080/20477724.2018.1480137

Verma, A., Stevenson, B. and Adler, B. (2013). "Leptospirosis in horses." Vet Microbiol **167**(1-2): 61-66; 10.1016/j.vetmic.2013.04.012

Vesey, P. M. and Kuramitsu, H. K. (2004). "Genetic analysis of *Treponema denticola* ATCC 35405 biofilm formation." Microbiology **150**(Pt 7): 2401-2407; 10.1099/mic.0.26816-0

Vinetz, J. M., Glass, G. E., Flexner, C. E., Mueller, P. and Kaslow, D. C. (1996). "Sporadic urban leptospirosis." Ann Intern Med **125**(10): 794-798; 10.7326/0003-4819-125-10-199611150-00002

Vinod Kumar, K., Lall, C., Vimal Raj, R., Vedhagiri, K. and Vijayachari, P. (2016). "Molecular detection of pathogenic leptospiral protein encoding gene (*lipL32*) in environmental aquatic biofilms." Lett Appl Microbiol **62**(4): 311-315; 10.1111/lam.12533

Wacker, W. B., Donoso, L. A., Kalsow, C. M., Yankeelov, J. A., Jr. and Organisciak, D. T. (1977). "Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina." J Immunol **119**(6): 1949-1958

Ward, K. H., Olson, M. E., Lam, K. and Costerton, J. W. (1992). "Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants." J Med Microbiol **36**(6): 406-413; 10.1099/00222615-36-6-406

Weil, A. (1886). "Ueber eine eigenthümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende, acute Infectionskrankheit." Deutsch. Arch. Klin. Med **38**: 209

Weis, S., Rettinger, A., Bergmann, M., Llewellyn, J. R., Pantchev, N., Straubinger, R. K. and Hartmann, K. (2017). "Detection of *Leptospira* DNA in urine and presence of specific antibodies in outdoor cats in Germany." J Feline Med Surg **19**(4): 470-476; 10.1177/1098612x16634389

Werry, H. and Gerhards, H. (1992). "The surgical therapy of equine recurrent uveitis." Tierärztliche Praxis **20**(2): 178-186

Whitcup, S. M. (1997). "The initiating stimuli for uveitis." Eye **11**(2): 167-170

WHO (1999). "Leptospirosis worldwide, 1999." Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire **74**(29): 237-242

Wiehen, L. E. (2012). "Retrospektive Analyse zum Vorkommen der Equinen rezidivierenden Uveitis-unter Berücksichtigung der Leptospireninfektion-an der LMU München von 01/2005-06/2012." Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Wild, C. J., Greenlee, J. J., Bolin, C. A., Barnett, J. K., Haake, D. A. and Cheville, N. E. (2002). "An improved immunohistochemical diagnostic technique for canine leptospirosis using antileptospiral antibodies on renal tissue." J Vet Diagn Invest **14**(1): 20-24; 10.1177/104063870201400105



Williams, C. S., Siddique, I. H. and Sapp, W. J. (1981). "Studies on the kidneys of pregnant hamsters infected with *Leptospira canicola*." Br J Exp Pathol **62**(2): 165-171

Williams, R. D., Morter, R. L., Freeman, M. J. and Lavignette, A. M. (1971). "Experimental chronic uveitis. Ophthalmic signs following equine leptospirosis." Invest Ophthalmol **10**(12): 948-954

Witmer, R. (1954). "Periodic ophthalmia in horses." American Journal of Ophthalmology **37**(2): 243-253

Witmer, R., Löhrer, J. and Wiesmann, E. (1953). "Zur Ätiologie, Diagnose und Therapie der periodischen Augenentzündung (p. A.) des Pferdes." Schweiz Arch Tierheilk **95**(8): 419-439

Wollanke, B. (1995). "Untersuchungen zur Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU)." Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Wollanke, B. (2002). "Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) als intraokulare Leptospirose." Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Wollanke, B. (2020). persönliche Mitteilung.

Wollanke, B., Geiger, T. and Gerhards, H. (2018). "Evaluation of" SNAP® Lepto"-ELISA and comparison with MAT and PCR results for diagnosis of leptospiral uveitis in horses using intraocular samples." Pferdeheilkunde **34**: 508-516

Wollanke, B., Gerhards, H., Brem, S., Gothe, R., Wolf, E., Herzog, S., Kopp, P. and Meyer, P. (1998). "Studies on vitreous and serum samples from horses with equine recurrent uveitis (ERU): The role of *Leptospira*, *Borrelia burgdorferi*, Borna disease virus and *Toxoplasma* in the etiology of ERU." Tagungsbericht des 29. Am. ACVO-Meetings, Seattle **29**: 31

Wollanke, B., Gerhards, H., Brem, S., Kopp, H. and Meyer, P. (1998). "Intraokulare und Serumantikörpertiter gegen Leptospiren bei 150 wegen equiner rezidivierender Uveitis (ERU) vitrektomierten Pferden." Berl Münch Tierärztl Wschr **111**: 134-139

Wollanke, B., Gerhards, H., Brem, S., Meyer, P. and Kopp, H. (2004). "Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU): Autoimmunkrankheit oder intraokulare Leptospireninfektion." Pferdeheilkunde **20**(4): 327-340

Wollanke, B., Gerhards, H., Brem, S., Wolf, E., Kopp, H. and Meyer, P. (2000). "Zur Leptospirenätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU): Ergebnisse der Untersuchungen von Serum-und Glaskörperproben." Tierarztl Prax **28**: 153-158

Wollanke, B., Rohrbach, B. W. and Gerhards, H. (2001). "Serum and vitreous humor antibody titers in and isolation of *Leptospira interrogans* from horses with recurrent uveitis." Journal of the American Veterinary Medical Association **219**(6): 795-800

Woodward, M. J., Swallow, C., Kitching, A., Dalley, C. and Sayers, A. R. (1997). "*Leptospira* hardjo serodiagnosis: a comparison of MAT, ELISA and Immunocomb." Vet Rec **141**(23): 603-604

Yager, R. H., Gochenour, W. S., Jr. and Wetmore, P. W. (1950). "Recurrent iridocyclitis (periodic ophthalmia) of horses; agglutination and lysis of leptospiras by serums deriving from horses affected with recurrent iridocyclitis." J Am Vet Med Assoc **117**(882): 207-209

Yamaguchi, T., Higa, N., Okura, N., Matsumoto, A., Hermawan, I., Yamashiro, T., Suzuki, T. and Toma, C. (2018). "Characterizing interactions of *Leptospira interrogans* with proximal renal tubule epithelial cells." BMC Microbiol **18**(1): 64; 10.1186/s12866-018-1206-8

Yupiana, Y., Vallée, E., Wilson, P., Weston, J. F., Benschop, J., Collins-Emerson, J. and Heuer, C. (2020). "On-farm risk factors associated with *Leptospira* shedding in New Zealand dairy cattle." Epidemiol Infect **148**: e219; 10.1017/s095026882000103x

Zilber, A. L., Belli, P., Artois, M., Kodjo, A. and Djelouadji, Z. (2016). "First Observation of *Leptospira interrogans* in the Lungs of *Rattus norvegicus*." Biomed Res Int **2016**: 9656274; 10.1155/2016/9656274

## **IX. ANHANG**

### **1. Lösungen und Puffer**

#### Puffer für die Silberimprägnierung:

- saures Aqua dest.:  
Aqua dest mit Zitronensäure auf pH 3,7 - 4,0 einstellen
  
- 1 % Silbernitratlösung:  
1g Silbernitrat mit saurem Aqua dest auf 100 mL auffüllen
  
- 2 % Silbernitratlösung:  
2g Silbernitrat mit saurem Aqua dest auf 100 ml auffüllen
  
- Gelatine 5 %:  
2,5g Gelatine mit einigen Tropfen absolutem Ethanol anfeuchten, danach mit saurem Aqua dest auf 50 ml auffüllen

#### Puffer für die Immunohistochemische Färbung:

- PBS-Puffer (Phosphate buffered saline):  
NaCl: 42,5g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O: 6,35g  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O: 1,95g  
Alle Komponenten in 5 Liter Aqua dest. lösen und auf pH 7,4 einstellen

## **2. Antikörper**

### Primärantikörper:

Anti-*Leptospira* rabbit antiserum

Raised against: Serovar Grippotyphosa type Moskva, strain Moskva V

Amc (Academic Medical Center)

FAO/OIE and National Collaborating Centre for Reference & Research on Leptospirosis  
(Meibergdreef 39, 1105 AZ Amsterdam, the Netherlands)

### Sekundärantikörper:

Biotinylated Anti-rabbit IgG (H+L)

(Fa. Biozol 85386 Eching, Deutschland)

### 3. Patientengut

(GK = Glaskörper, MAR = Mikroagglutinationsreaktion (bei Antikörpern gegen mehrere Serovare nur die Serovar mit dem höchsten Titer gelistet), Ct-Wert = Anzahl der PCR-Zyklen, bis spezifisches Amplifikat entstanden ist, also bis PCR „positiv“ geworden ist; ab 37 Zyklen gilt die PCR als „schwach positiv“, es wurden max. 40 Zyklen durchgeführt; „-“ nicht vorhanden, „+“ geringgradig, „++“ mittelgradig, „+++“ hochgradig)

**Tabelle 1: Übersicht über die Pferde, deren bei der Vitrektomie gewonnene Glaskörperproben für die Histologie verwendet wurden.**

Auge Nr.	Patient (biologische Kenndaten)	diffuse GK-Trübung	GK-Einlagerungen	PCR und Ct-Wert	MAR
1	7-jähriger Warmblutwallach	++	+	positiv (Ct 37)	>1:1600 (Grippotyphosa, Copenhageni)
2	5-jähriger Warmblutwallach	++	++	positiv (Ct 36)	>1:1600 (Grippotyphosa)
3	10-jähriger Warmbluthengst	-	+	positiv (Ct 38)	>1:400 (Grippotyphosa)
4	5-jährige Trakehenerstute	++	+	positiv (Ct 34)	>1:800 (Grippotyphosa)
5	4-jähriger Warmblutwallach	+++	++	positiv (Ct 37)	>1:3200 (Grippotyphosa)
6	6-jährige Islandstute	++	+	positiv (Ct 33)	>1:3200 (Grippotyphosa)
7	4-jährige Warmblutstute	++	++	positiv (Ct 35)	>1:3200 (Pomona)
8	5-jährige Warmblutstute	+++	+++	positiv (Ct 34)	>1:3200 (Grippotyphosa)
9	7-jähriger Trakehenerwallach	+++	++	positiv (Ct 33)	>1:3200 (Grippotyphosa)

10	8-jährige Islandstute	-	-	positiv (Ct 40)	>1:400 (Grippotyphosa)
11	11-jähriger Warmblutwallach	-	-	positiv (Ct 33)	>1:1600 (Grippotyphosa)
12	9-jähriger Paint Horse Wallach	+	++	positiv (Ct 34)	>1:3200 (Australis)
13	11-jähriger Islandwallach	+	++	positiv (Ct 34)	>1:3200 (Grippotyphosa)
14	6-jähriger Warmblutwallach	-	-	positiv (Ct 35)	>1:400 (Grippotyphosa)
15	7-jährige Friesenstute	+	++	positiv (Ct 29)	>1:3200 (Grippotyphosa)
16	4-jährige Warmblutstute	+++	+++	positiv (Ct 32)	>1:1600 (Grippotyphosa)
17	7-jährige Warmblutstute	++	+	positiv (Ct 37)	>1:800 (Hardjo)
18	5-jähriger Warmblutwallach	++	+	positiv (Ct 32)	>1:3200 (Grippotyphosa)
19	15-jähriger Warmblutwallach	+	++	positiv (Ct 33)	>1:400 (Grippotyphosa)
20	4-jährige Warmblutstute	+	+	positiv (Ct 30)	>1:800 (Altoduro)
21	10-jähriger Friesenwallach	++	+	positiv (Ct 30)	>1:400 (Altoduro)
22	13-jährige Warmblutstute	+	+++	positiv (Ct 38)	>1:3200 (Australis)
23	14-jährige Warmblutstute	+++	+	positiv (Ct 39)	>1:3200 (Grippotyphosa)
24	4-jähriger Islandwallach	-	+	positiv (Ct 36)	>1:3200 (Grippotyphosa)
25	6-jährige Warmblutstute	-	+	positiv (Ct 32)	>1:3200 (Grippotyphosa)
26	2-jährige Appaloosastute	-	+	positiv (Ct 29)	>1:3200 (Grippotyphosa)

27	7-jähriger Warmblutwallach	+	++	positiv (Ct 36)	>1:400 (Grippotyphosa)
28	7-jähriger Warmblutwallach	+	+++	positiv (Ct 36)	>1:3200 (Grippotyphosa)
29	12-jähriger Islandwallach	++	+++	positiv (Ct 36)	>1:3200 (Grippotyphosa)
30	3-jähriger Warmbluthengst	++	++	positiv (Ct 39)	>1:3200 (Grippotyphosa)
31	4-jähriger Warmblutwalach	+++	+	positiv (Ct 32)	>1:3200 (Altoduro)
32	7-jährige Warmblutstute	+	+	positiv (Ct 35)	>1:3200 (Grippotyphosa)
33	8-jähriger Quarter Horse Wallach	-	+	positiv (Ct 40)	>1:3200 (Grippotyphosa)
34	13-jähriger Kaltblutwallach	-	-	positiv (Ct 35)	>1:3200 (Australis)
35	14-jähriger PRE-Wallach	+	-	positiv (Ct 35)	>1:3200 (Grippotyphosa)
36	4-jähriger Traberwallach	+++	+++	positiv (Ct 33)	>1:3200 (Grippotyphosa)
37	6-jährige Warmblutstute	+	+	positiv (Ct 34)	>1:3200 (Grippotyphosa)
38	5-jährige Warmblutstute	++	++	positiv (Ct 35)	>1:3200 (Pomona)
39	5-jähriger Islandwallach	++	+	positiv (Ct 33)	>1:100 (Altoduro)
40	5-jähriger Warmblutwallach	+	+	positiv (Ct 38)	>1:3200 (Grippotyphosa)
41	10-jähriger Warmblutwallach	-	+	positiv (Ct 39)	>1:800 (Grippotyphosa)
42	5-jähriger Quarter Horse Wallach	+++	+	positiv (Ct 35)	>1:3200 (Grippotyphosa)
43	18-jährige Warmblutstute	+	++	positiv (Ct 31)	>1:200 (Saxkoebing)



44	5-jährige Warmblutstute	+++	+	positiv (Ct 35)	>1:3200 (Grippotyphosa)
45	8-jähriger Warmblutwallach	+	++	positiv (Ct 35)	>1:200 (Grippotyphosa)
46	5-jähriger Warmblutwallach	++	+	positiv (Ct 32)	>1:200 (Grippotyphosa)
47	5-jährige Warmblutstute	++	++	positiv (Ct 33)	>1:1600 (Grippotyphosa)
48	4-jähriger Warmblutwallach	++	+	positiv (Ct 33)	>1:100 (Grippotyphosa)
49	3-jährige Warmblutstute	+++	+++	positiv (Ct 38)	negativ
50	10-jähriger Warmblutwallach	-	++	positiv (Ct 36)	>1:3200 (Grippotyphosa)
51	6-jährige Warmblutstute	-	+	positiv (Ct 36)	>1:3200 (Grippotyphosa)
52	11-jähriger Warmblutwallach	-	+	positiv (Ct 38)	negativ
53	7-jähriger PRE-Hengst	+++	++	positiv (Ct 39)	>1:3200 (Grippotyphosa)
54	10-jährige PRE-Stute	-	++	positiv (Ct 39)	>1:3200 (Australis)
55	9-jähriger Warmblutwallach	-	+	positiv (Ct 38)	>1:800 (Grippotyphosa)
56	15-jährige Warmblutstute	+++	+	positiv (Ct 39)	>1:3200 (Grippotyphosa)
57	8-jährige Pony-Stute	++	+	positiv (Ct 32)	>1:3200 (Grippotyphosa)
58	7-jähriger Islandwallach	+	-	positiv (Ct 36)	negativ
59	5-jähriger- Islandwallach	+	+	positiv (Ct 35)	>1:3200 (Grippotyphosa)
60	5-jähriger Islandwallach	-	+	positiv (Ct 32)	>1:800 (Australis)

61	9-jähriger Islandwallach	+++	+++	positiv (Ct 33)	>1:800 (Ictero- haemorrhagiae)
62	4-jähriger PRE-Wallach	-	-	positiv (Ct 35)	>1:3200 (Grippotyphosa)
63	16-jähriger Islandwallach	-	-	positiv (Ct 38)	>1:3200 (Grippotyphosa)
64	16-jährige Warmblutstute	-	+	positiv (Ct 39)	>1:400 (Grippotyphosa)
65	7-jähriger Warmblutwallach	+	++	positiv (Ct 29)	>1:3200 (Pomona)
66	12-jähriger Friesenwallach	-	+	positiv (Ct 36)	>1:3200 (Grippotyphosa)
67	6-jährige Cruzadostute	++	+	positiv (Ct 35)	>1:800 (Pomona)
68	24-jähriger Warmblutwallach	+++	++	positiv (Ct 35)	>1:3200 (Grippotyphosa)
69	5-jähriger Tinkerwallach	+	-	positiv (Ct 35)	>1:800 (Ictero- haemorrhagiae)
70	3-jährige Warmblutstute	++	+	positiv (Ct 29)	>1:3200 (Grippotyphosa)
71	12-jähriger Warmblutwallach	+++	++	positiv (Ct 34)	>1:3200 (Grippotyphosa)
72	6-jähriger Warmblutwallach	-	-	positiv (Ct 36)	>1:100 (Grippotyphosa)
73	4-jähriger Warmblutwallach	+	++	positiv (Ct 32)	>1:3200 (Grippotyphosa)
74	5-jährige Warmblutstute	+++	+++	positiv (Ct 38)	>1:3200 (Grippotyphosa)
75	9-jähriger Trakehenerstute	+	-	positiv (Ct 39)	negativ
76	6-jähriger Lusitanowallach	+++	+++	positiv (Ct 36)	>1:3200 (Grippotyphosa)
77	4-jähriger Friesenwallach	+	+	positiv (Ct 33)	>1:1600 (Ictero- haemorrhagiae)

78	10-jähriger Warmblutwallach	+++	+++	positiv (Ct 38)	>1:3200 (Hardjo)
79	14-jähriger Vollblutwallach	+++	++	positiv (Ct 39)	>1:200 (Grippotyphosa)
80	8-jähriger Warmblutwallach	-	-	negativ	negativ
81	23-jährige Haflingerstute	-	-	negativ	negativ
82	17-jähriger Warmblutwallach	-	-	negativ	negativ

## X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. III-1:** Grafische Darstellung der Vorgehensweise von der Untersuchung des Pferdes über die Probennahme bis zu den unterschiedlichen Untersuchungen der Probe und der Auswertung der Ergebnisse. (Erstellt mit BioRender.com) ..... 35
- Abb. III-2:** Pferdeauge mit chronischer ERU; Entzündungsfreies Intervall einer chronisch rezidivierenden Uveitis bei einem 4-jährigen Friesenwallach mit typischen Befunden im Sinne der ERU: diffuse Hornhauttrübung, Pupille durch Gabe eines Mydriatikums ca. 2/3 weit, Dyskorie der Pupille durch multiple hintere Synechien (roter Pfeil), ventro-temporal rauchige Trübung im Bereich der Linsenvorderfläche, diffuse Glaskörpertrübung ..... 38
- Abb. III-3:** Pferdeauge mit akutem Schub einer ERU; abklingender klassischer akuter Uveitisschub im Verlauf einer ERU bei einem 10-jährigen Warmblutwallach: geringgradige diffuse Hornhauttrübung mit Neovaskularisation (ventral), vordere Augenkammer zu 2/3 mit frischem entzündlichem Exsudat gefüllt und ventral im Bereich der Blutgefäße zusätzlich älteres zusammengezogenes Gerinnsel, Pupille durch Gabe eines Mydriatikums ca. 2/3 weit, grün-gelblicher Fundusreflex aufgrund der hochgradigen diffusen Glaskörpertrübung. .... 38
- Abb. III-4:** Pferdeauge mit chronischer ERU; Entzündungsfreies Intervall einer chronisch rezidivierenden Uveitis bei einem 14-jährigen Englischen Vollblutwallach mit typischen Befunden im Sinne der ERU: geringgradige diffuse Hornhauttrübung, multiple hintere Synechien (rote Pfeile), dorsal und nasal des Blitzreflexes auf der Hornhaut sind entzündliche Einlagerungen im Glaskörper zu sehen. .... 39
- Abb. III-5:** Pferdeauge mit chronischer ERU; entzündungsfreies Intervall einer chronisch rezidivierenden Uveitis bei einem 6-jährigen Lusitanowallach mit Birkauge und typischen Befunden im Sinne der ERU: hintere Synechien (ventral und temporal), zwei Irisresiduen (nasal-zentral) (roter Pfeil) auf der Linsenvorderfläche, mittelgradige entzündlich bedingte Glaskörpereinlagerungen, Pupille durch Gabe eines Mydriatikums ca. 2/3 weit. .... 39
- Abb. III-6:** Pferdeauge mit ERU im Endstadium; entzündungsfreies Intervall einer chronisch rezidivierenden Uveitis bei einer 8-jährigen Hannoveraner Fuchsstute: ERU im Endstadium mit Bulbusatrophie, sehr flacher vorderer Augenkammer, großflächigen hinteren Synechien in Miosisstellung (*Seclusio pupillae*), fortgeschrittene Katarakt. .... 40
- Abb. III-7:** Vorderansicht eines Pferdes mit chronischer ERU; Die Stute aus Abb. III-6 von vorne: die hochgradige Atrophia bulbi des linken Auges ist bereits makroskopisch erkennbar. .... 40
- Abb. III-8:** Ausgangssituation für die Vitrektomie: Infusionsleitung (weißer Pfeil) und

<i>Vitrektom (roter Pfeil) befinden sich über einen Zugang in der Sklera im Glaskörperraum. .</i>	42
<b>Abb. III-9:</b> <i>Probenentnahme im Zuge der Vitrektomie (Ansicht auf Monitor übertragenes Bild); Blick durch Pupillenöffnung in den Glaskörperraum. Das Vitrektom wurde über den dorsalen Zugang in der Sklera in den Glaskörperraum eingeführt. Am Ende des Operationsgerätes befindet sich die Öffnung (weißer Pfeil), die das Glaskörpermateriale und die darin enthaltenen Entzündungsprodukte ansaugt, zerschneidet und absaugt. Auf dem Bild sind deutlich erkennbare Glaskörpereinlagerungen zu sehen, die durch das Vitrektom angesaugt werden (roter Pfeil).</i>	42
<i>Abb. IV-1: Kulturleptospiren: L. interrogans Serovar Australis; Warthin-Starry-Färbung ...</i>	49
<i>Abb. IV-2: Kulturleptospiren: L. interrogans Serovar Autumnalis; Warthin-Starry-Färbung</i>	50
<i>Abb. IV-3: Kulturleptospiren: L. interrogans Serovar Bratislava; Warthin-Starry-Färbung.</i>	51
<i>Abb. IV-4: Kulturleptospiren: L. interrogans Serovar Grippotyphosa; Warthin-Starry-Färbung.....</i>	52
<i>Abb. IV-5: Kulturleptospiren: L. interrogans Serovar Icterohaemorrhagiae; Warthin-Starry-Färbung.....</i>	53
<i>Abb. IV-6: Kulturleptospiren: L. interrogans Serovar Pomona; Warthin-Starry-Färbung ....</i>	54
<i>Abb. IV-7: Kulturleptospiren: L. interrogans Serovar Australis; IHC.....</i>	55
<i>Abb. IV-8: Kulturleptospiren: L. interrogans Serovar Autumnalis; IHC .....</i>	56
<i>Abb. IV-9: Kulturleptospiren: L. interrogans Serovar Bratislava; IHC.....</i>	56
<i>Abb. IV-10: Kulturleptospiren: L. interrogans Serovar Grippotyphosa; IHC .....</i>	57
<i>Abb. IV-11: Kulturleptospiren: L. interrogans Serovar Icterohaemorrhagiae; IHC .....</i>	57
<i>Abb. IV-12: Kulturleptospiren: L. interrogans Serovar Pomona; IHC .....</i>	58
<i>Abb. IV-13: Übersichtsaufnahme: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge.....</i>	61
<i>Abb. IV-14: Übersichtsaufnahme: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge.....</i>	61
<i>Abb. IV-15: Übersichtsaufnahme: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge.....</i>	62
<i>Abb. IV-16: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge .....</i>	63
<i>Abb. IV-17: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge .....</i>	63
<i>Abb. IV-18: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge .....</i>	64
<i>Abb. IV-19: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge .....</i>	64
<i>Abb. IV-20: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge .....</i>	65
<i>Abb. IV-21: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge .....</i>	66
<i>Abb. IV-22: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge .....</i>	66
<i>Abb. IV-23: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge .....</i>	67
<i>Abb. IV-24: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge .....</i>	67

<i>Abb. IV-25: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge</i> .....	68
<i>Abb. IV-26: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge</i> .....	68
<i>Abb. IV-27: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge</i> .....	69
<i>Abb. IV-28: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge</i> .....	69
<i>Abb. IV-29: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge</i> .....	70
<i>Abb. IV-30: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge</i> .....	70
<i>Abb. IV-31: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge</i> .....	71
<i>Abb. IV-32: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge</i> .....	72
<i>Abb. IV-33: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge</i> .....	72
<i>Abb. IV-34: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge</i> .....	73
<i>Abb. IV-35: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge</i> .....	73
<i>Abb. IV-36: Vergrößerung von Abb. IV-15: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge</i> .....	74
<i>Abb. IV-37: Übersichtsaufnahme: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: mittelgradige diffuse Glaskörpertrübung mit fadenförmigen entzündlichen Einlagerungen; MAR negativ; PCR positiv</i> .....	75
<i>Abb. IV-38: Übersichtsaufnahme: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: mittelgradige diffuse Glaskörpertrübung mit fadenförmigen entzündlichen Einlagerungen; MAR negativ; PCR positiv</i> .....	75
<i>Abb. IV-39: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; klinischer Befund: Glaskörper ohne pathologischen Befund IHC; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:400); PCR positiv</i> .....	76
<i>Abb. IV-40: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; klinischer Befund: Glaskörper ohne pathologischen Befund IHC; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:400); PCR positiv</i> .....	77
<i>Abb. IV-41: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; klinischer Befund: Glaskörper ohne pathologischen Befund IHC; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:400); PCR positiv</i> .....	77
<i>Abb. IV-42: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: hochgradige diffuse Glaskörpertrübung mit wolkigen Einlagerungen; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:3200); PCR positiv</i> .....	78
<i>Abb. IV-43: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: mittelgradige diffuse Glaskörpertrübung mit dicken membranartigen Einlagerungen; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:1600); PCR positiv</i> .....	79

<i>Abb. IV-44: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; klinischer Befund: Glaskörper ohne pathologischen Befund IHC; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:400); PCR positiv .....</i>	<i>79</i>
<i>Abb. IV-45: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: mittelgradige diffuse Glaskörpertrübung mit fadenförmigen entzündlichen Einlagerungen; MAR negativ; PCR positiv .....</i>	<i>81</i>
<i>Abb. IV-46: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: mittelgradige diffuse Glaskörpertrübung mit fadenförmigen entzündlichen Einlagerungen; MAR negativ; PCR positiv .....</i>	<i>81</i>
<i>Abb. IV-47: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: mittelgradige diffuse Glaskörpertrübung mit fadenförmigen entzündlichen Einlagerungen; MAR negativ; PCR positiv .....</i>	<i>82</i>
<i>Abb. IV-48: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: hochgradige diffuse Glaskörpertrübung mit wolkigen Einlagerungen; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:3200); PCR positiv.....</i>	<i>82</i>
<i>Abb. IV-49: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: hochgradige diffuse Glaskörpertrübung mit wolkigen Einlagerungen; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:3200); PCR positiv.....</i>	<i>83</i>
<i>Abb. IV-50: Vergrößerung von Abb. IV-49 .....</i>	<i>83</i>
<i>Abb. IV-51: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: hochgradige diffuse Glaskörpertrübung mit wolkigen Einlagerungen; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:3200); PCR positiv.....</i>	<i>84</i>
<i>Abb. IV-52: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: hochgradige diffuse Glaskörpertrübung mit hochgradigen Einlagerungen; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Grippotyphosa (1:3200); PCR positiv .....</i>	<i>84</i>
<i>Abb. IV-53: Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Auge; IHC; klinischer Befund: Glaskörper ohne pathologischen Befund; Serovar mit höchstem Titer in der MAR: Australis (1:3200); PCR positiv .....</i>	<i>85</i>
<i>Abb. V-1: Elektronenmikroskopische Darstellung von L. Grippotyphosa aus der Kultur, welche experimentell in den Glaskörperraum augengesunder Pferde injiziert wurden (Niedermaier, 2002). .....</i>	<i>87</i>
<i>Abb. V-2: Elektronenmikroskopische Darstellung von Leptospiren aus Glaskörpermaterial von an ERU erkrankten Augen (Niedermaier, 2002). .....</i>	<i>87</i>
<i>Abb. V-3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Phagozyten mit eingeschlossener</i>	



---

<i>Leptospire; Skala: 2µm (Brandes, 2020).</i> .....	88
<i>Abb. V-4: Rasterelektronenmikroskopisches Bild, das im Jahr 1999 mit einer unverdünnten Glaskörperprobe aus einem an ERU erkrankten Pferdeauge erstellt wurde (Wollanke, 2020).</i> .....	89

## **XI. TABELLENVERZEICHNIS**

<i><b>Tabelle 1:</b> Übersicht über die Pferde, deren bei der Vitrektomie gewonnene Glaskörperproben für die Histologie verwendet wurden.....</i>	<i><b>136</b></i>
---	-------------------

## **XII. DANKSAGUNG**

Zuerst möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meiner Doktormutter Frau Priv.-Doz. Dr. Bettina Wollanke für die Überlassung dieses interessanten Themas, Ihre stets freundliche Unterstützung und Betreuung, die konstruktiven Hinweise sowie die Korrektur dieser Arbeit bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Priv.-Doz. Dr. Rebecca Kenngott für das große mir entgegengebrachte Interesse an meiner Arbeit sowie die Hilfe bei der histologischen Arbeit, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau Monika Settles möchte ich herzlich danken für die großartige Hilfe bei den Versuchen, sowie die unendliche Suche nach Leptospiren am Mikroskop.

Ein herzliches Dankeschön geht an Frau Hauser vom Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit für die freundliche Hilfe und Bereitstellung der Kulturleptospiren.

Bei Herr Prof. Maierl bedanke ich mich für das Vertrauen und die Bereitstellung der Materialien und Geräte am Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie der LMU.

Meinen Kolleginnen und Kollegen der Chirurgischen Abteilung der Pferdeklinik danke ich für den großartigen Zusammenhalt.

Ein großes Dankeschön geht an meine Freunde für die schöne Zeit und Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit, vor allem an Niklas Bürgener für das spontane Korrekturlesen, an Martin Scherm für die Hilfe bei der Bildbearbeitung und an meine Schwester Carolin Ackermann für die Unterstützung des englischsprachigen Abschnittes.

Axel Kneuertz möchte ich besonders danken, für seine Unterstützung und dafür, dass er mir immer den Rücken freigehalten hat.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Vater bedanken, der immer an mich geglaubt hat, jedoch das Ende meines Studiums, sowie die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht mehr miterleben durfte.